

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Catharina Scholl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2009

**Identifizierung und Charakterisierung kleiner
nicht-kodierender RNA Moleküle aus dem Zellkern
muriner Embryonaler Stammzellen und Embryonic
Bodies**

Gutachter:
Prof. Dr. Stefan Wölfl
Prof. Dr. Andres Jäschke

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Wölfl in der Zeit von September 2004 bis Juli 2009 am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), Abteilung Biologie der Fakultät für Biowissenschaften der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie wörtliche oder inhaltliche Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Catharina Scholl

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mir diese Dissertation möglich gemacht haben und mich bei diesem Vorhaben unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Wölfl für die geduldige Betreuung meiner Arbeit, für das interessante Thema, für viele konstruktive Diskussionen und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Prof. Dr. Andres Jäschke danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Den Kollegen meiner Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank für das gute Arbeitsklima und die großartige gemeinsame Zeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Ana Kitanovic und Dr. Igor Kitanovic, die mir immer mit wissenschaftlichem Rat zur Seite standen. Meinen anderen Mitstreitern Hamed Alborzinia, Ngoc Van Bui, Suzan Can und Steffen Walczak danke ich für ihre Kollegialität und viele interessante Gespräche. Besonders möchte ich auch Michael Hofer für die Unterstützung bei der Erstellung der ES Bibliothek danken. Für ihre technische Assistenz und besonders für die Unterstützung bei der Isolation unzähliger Plasmide möchte ich mich bei Elke Lederer und unseren Azubis Doreen Winkelmann, André Rückert, Maike Büchler und Marie-Sophie Karipidis bedanken. Danken möchte ich außerdem Petra Fellhauer für ihre Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Kerry Tucker, Dr. Maya Shaked und Kathrin Weißmüller für ihre Unterstützung beim Erlernen des Stammzelldifferenzierungsmodells und für das Überlassen von ES Zellen und primären Neuronen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden. Allen voran Simone König für viele unterstützende Gespräche, „süße Überlebenspakete“ und für das Lektorat meiner Arbeit.

Einen großen Dank möchte ich an meine Familie richten. Vor allem möchte ich aber meinen Eltern danken, dass sie mir diese Chance möglich gemacht haben.

Titel: Identifizierung und Charakterisierung kleiner nicht-kodierender RNA Moleküle aus dem Zellkern muriner Embryonaler Stammzellen und Embryonic Bodies

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl
2. Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke

In den vergangenen Jahren hat sich unser Verständnis von der funktionellen Diversität der RNA erheblich vergrößert. Besonders konnte eine große Anzahl nicht-kodierender RNA (ncRNA) Moleküle identifiziert werden, die entscheidende Schritte in der zellulären Differenzierung steuern. Angesichts der komplexen Natur der neuronalen Entwicklung wächst zunehmend die Erkenntnis, dass nicht-kodierende RNA eine bedeutende und bislang noch nicht aufgeklärte Rolle in der Kontrolle der zugrunde liegenden zellulären Differenzierungsprozesse spielen könnte. Zusätzlich zu ihrer Wichtigkeit für die neuronale Entwicklung könnte nicht-kodierende RNA auch an der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sein.

Um neue nicht-kodierende RNA aufklären zu können, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wurde ein *in vitro* Modell der frühen neuronalen Differenzierung verwendet und aus zwei unterschiedlichen Differenzierungsstadien kleine nukleare RNA isoliert. Ausgehend vom Embryonalen Stammzellen (ES Zellen) der Maus wurden Spheroblasten acht Tage alter Embryonic Bodies (EBs) erzeugt. Aus beiden Entwicklungsstadien, ES Zellen und EBs, wurde RNA isoliert und dazu verwendet cDNA Bibliotheken aus kleiner nuklearer RNA herzustellen. Ein Aliquot der isolierten RNA wurde mittels *in vitro* Capping mit einer m⁷G-Cap-Struktur versehen. Hierdurch konnte ein spezifisches Muster der kleinen nuklearen RNA innerhalb der beiden Differenzierungsstadien aufgedeckt werden. RNA entsprechender Größe wurde dazu verwendet um cDNA Bibliotheken der beiden Entwicklungsstadien herzustellen. Insgesamt konnten 14 neue nukleare nicht-kodierende RNA Kandidaten in den beiden cDNA Bibliotheken identifiziert werden. Vier davon entfielen auf die cDNA Bibliothek aus ES Zellen, zehn auf die der EBs. Neun der neuen ncRNA Kandidaten Genen konnte in intronischen Bereichen des Genoms lokalisiert werden, nur zwei ncRNA Kandidaten konnten exonischen Regionen zugeordnet werden. Die Expression eines ncRNA Kandidaten (2-57) konnte im Northern Blot bestätigt werden. 2-57 zeigte eine ausgeprägte Expression vor allem in EBs und AtT-20 Zellen, während er in ES Zellen nicht exprimiert war.

Neben den neuen ncRNA Kandidaten wurden auch bekannte ncRNAs, die in den cDNA Bibliotheken nachgewiesen werden konnten, auf ihre Expression untersucht. Pre-mi-690 und Y3 scRNA zeigten hierbei eine geregelte Expression in den beiden untersuchten Differenzierungsstadien. Beide waren in EBs schwächer exprimiert, als in ES Zellen und den untersuchte Zelllinien

Title: Identification and characterization of small nuclear non coding RNA from mouse embryonic stem cells and embryonic bodies

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl
2. Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke

In recent years our understanding of the functional diversity of RNA has expanded widely. In particular a wide range of non-protein-coding RNA molecules were identified that regulate crucial steps in cellular differentiation. Given the complex nature of neuronal development there is a growing awareness that non-coding RNA may play a more pronounced, yet unexplored role in the control of the underlying cellular differentiation processes. In addition to being important for neuronal development, non-coding RNA may also contribute to the development of neuro-degenerative diseases.

To screen for new non-coding RNA that may be involved in these processes we used an *in vitro* model for early neuronal differentiation and isolated small nuclear RNA from two distinct cellular differentiation stages. Starting from mouse embryonic stem cells (mES), spheroblasts of 8 day old embryonic bodies (EBs) were generated. RNA from both mES and EBs were isolated and used to create cDNA libraries of small nuclear RNA. An aliquot of the isolated RNA was *in vitro* capped, revealing two distinct patterns of small nuclear RNA of the two differentiation stages. RNAs of corresponding size were used to create cDNA libraries from both cell stages. In total, we identified 14 novel nuclear non coding RNA (ncRNA) candidates, four from mES cells and 10 from EBs. Of the candidate ncRNA genes, 9 mapped to introns, while only two mapped to exonic regions. The expression of one candidate ncRNAs (2-57) could be confirmed by northern blot analysis. 2-57 showed a pronounced expression in EBs and AtT-20 cells, but not in mES cells.

Beside the new ncRNA candidates the expression of known ncRNA molecules, which were identified in the cDNA libraries, were analysed. Pre-miR-690 and Y3 scRNA showed a distinct expression within the two stages of differentiation. Both were weakly expressed in EBs, but showed a strong expression in mES cells and the other analysed cell lines.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	13
1.1 Nicht-kodierende RNA	14
1.2 NcRNAs mit infrastrukturellen Funktionen	16
1.2.1 Small nuclear RNA (snRNA)	16
1.2.2 Small nucleolar RNA (snoRNA)	16
1.2.3 Y RNA	19
1.3 Regulatorische ncRNA Klassen	20
1.3.1 Micro RNA (miRNA)	20
1.3.2 Short Interfering RNA (siRNA)	23
1.3.3 Piwi-interacting RNA (piRNA)	24
1.3.4 Small modulatory RNA	27
1.4 Frühe Embryonalentwicklung und Embryonale Stammzellen	28
1.4.1 Frühe Embryonalentwicklung	28
1.4.2 Embryonale Stammzellen und Pluripotenz	28
1.4.3 Differenzierung von ES Zellen und Entwicklung neuronaler Zellen	31
1.4.4 Einfluss von miRNAs auf die frühe Embryonal- und Neuronalentwicklung	33
2. Motivation und Ziel der Arbeit	37
3. Material und Methoden	39
3.1 Material	39
3.2 Methoden	55
3.2.1 Zellkultur	55
3.2.2 Fraktionierung der Zellkerne und des Zytoplasma	56
3.2.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren	57
3.2.3.1 RNA Isolation	57
3.2.3.2 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA	58
3.2.3.3 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren	58
3.2.4 RNA- und DNA-Gelelektrophorese	59
3.2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
3.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese zu Auftrennung von DNA	60
3.2.5 Gelextraktion aus Polyacrylamid-Gelen	60
3.2.6 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	60
3.2.6.1 <i>In vitro</i> RNA-Capping	60
3.2.6.2 Markierung von DNA Oligonukleotiden	61
3.2.7 Erstellen einer cDNA Bibliothek aus nuklearer RNA	61

3.2.7.1 Probenvorbereitung.....	61
3.2.7.2 C-Tailing der RNA.....	62
3.2.7.3 Dephosphorylierung mit Tobacco Acid Pyrophosphatase.....	62
3.2.7.4 5' Adapter Ligation.....	63
3.2.7.5 Reverse Transkription.....	63
3.2.7.6 Amplifikation der cDNA.....	63
3.2.7.7 Ligation in pCR [®] 2.1 Vektor	64
3.2.7.8 Elektrottransformation in <i>E.coli</i> Zellen.....	64
3.2.8 Analyse und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek.....	65
3.2.8.1 Überprüfungen der Klonierung.....	65
3.2.8.2 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	66
3.2.8.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	67
3.2.9 Northern-Blot.....	68
4. Ergebnisse.....	71
4.1 Qualitative Untersuchung der Verteilung nicht-kodierender RNA Moleküle.....	71
4.2 Identifizierung neuer ncRNA Kandidaten aus ES Zellen und EBs.....	73
4.3 Analyse der EB Bibliotheken.....	77
4.4 Charakterisierung der neuer ncRNA Kandidaten aus der EB Bibliothek.....	81
4.4.1 Unbekannte ncRNA Kandidaten intronischen Ursprungs.....	83
4.4.2 Unbekannte ncRNA Kandidaten exonischen und intergenischen Ursprungs.....	86
4.4.3 ncRNAs mit Homologie zu humaner ncRNAs.....	87
4.4.4 Bekannte ncRNA mit einer regulierte Expression während der Differenzierung.....	88
4.5 Analyse der Bibliotheken aus ES Zellen.....	95
4.6 Charakterisierung neuer ncRNA Kandidaten aus der ES Bibliothek.....	97
4.7 Vergleich der ncRNAs aus ES Zellen und EBs.....	100
5. Diskussion.....	101
6. Anhang.....	113
6.1 Einheiten.....	113
6.2 Abkürzungen.....	114
6.3 Alignment neue ncRNA Kandidaten aus EB Bibliotheken.....	117
6.4 Alignment neue ncRNA Kandidaten aus ES Bibliotheken.....	121
6.5 Sequenzen aller sequenzierte Klone der ES Bibliotheken.....	122
6.6 Sequenzen aller sequenzierte Klone der EB Bibliotheken.....	125
7. Referenzen.....	131

1. Einleitung

Bis vor wenigen Jahren galt in der Zellbiologie das zentrale Dogma, dass an der Steuerung aller biochemischen Prozesse in einer Zelle Proteine beteiligt sind. Ribonukleinsäuren galten hingegen lange Zeit nur als Moleküle, die die Übermittlung der genetischen Information von der DNA zum Protein vermitteln, indem sie als Überträger der Information (messenger RNA) oder Komponente des Proteinbiosyntheseapparates (ribosomale RNA und transfer RNA) fungieren.

Nachdem vor etwa zwanzig Jahren Sid Altman, mit RNase P (Kole und Altman, 1979) und Thomas R. Cech, mit sich selbst spleißender RNA (Cech, 1986), die ersten katalytisch aktiven Ribonukleinsäuren entdeckt hatten, erkannte man, dass RNA viele weitere Aufgaben erfüllen kann. RNA spielt in Organismen nicht nur eine Rolle als infrastruktureller Baustein, sondern steuert auch katalytische und regulatorische Vorgänge. Mit der vollständigen Entschlüsselung der ersten Genome und mit Genom-weiten Transkriptionsstudien konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil des Genoms multizellulärer Organismen durch Sequenzen besetzt ist, die proteinkodierende Gene repräsentieren. So besteht z. B. das humane Transkriptom zu 98% aus nicht-proteinkodierenden Sequenzen. Bei einer so großen Anzahl ergibt sich die Frage, ob es sich bei diesen Sequenzen vornehmlich um transkriptionelle Nebenprodukte bzw. evolutionäre Überreste handelt, oder ob diese Transkripte eine biologische Bedeutung haben. Die Tatsache, dass ein großer Teil dieser Transkripte sowohl zelltypspezifisch ist, als auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eines Organismus auftritt, deutet darauf hin, dass die Expression dieser Transkripte geregelt ist und sie somit biologische Funktionen in der Zelle besitzen müssen. Sowohl die Ergebnisse der Transkriptionsstudien, als auch das Wissen über die funktionelle Diversität von RNA-Molekülen unterstützen die Vermutung, dass biochemische Prozesse in Organismen nicht nur durch Proteine, sondern auch durch Ribonukleinsäuren gesteuert werden können. (Mattick und Makunin, 2006) Die Entwicklung eines Organismus und sein phänotypisches Erscheinungsbild werden also nicht nur durch sein Proteom, sondern auch durch seine nicht-kodierende RNA (ncRNA) geprägt. Im letzten Jahrzehnt konnte eine Vielzahl verschiedener Klassen nicht-kodierender RNA Typen in Folge intensiver Forschung und der Einführung neuer Methoden identifiziert und charakterisiert werden. Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Klassen nicht-kodierender RNA kurz vorgestellt und beschrieben werden. Der Fokus wird hierbei neben einigen

ausgewählten Klassen infrastruktureller RNA auf den regulatorischen RNAs liegen. Auf die Beschreibung von tRNA und rRNA wird an dieser Stelle verzichtet, da diese bereits ausreichend charakterisiert sind und ihnen nach derzeitigem Wissensstand vermutlich hauptsächlich infrastrukturelle Aufgaben zukommen.

1.1 Nicht-kodierende RNA

Unter dem Begriff nicht-kodierende RNA (ncRNA) werden eine ganze Reihe teilweise strukturell sehr unterschiedlicher Ribonukleinsäuremoleküle zusammengefasst. Einige haben relativ kurze Sequenzen aus 20 bis etwa 300 Nukleotiden, andere sind extrem lang (z.B. AIR:108000 nt). Sie beeinflussen sehr unterschiedliche biologische Prozesse. So regulieren sie beispielsweise epigenetische und zelluläre Vorgänge, Entwicklungsprozesse und sind an der Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie z. B. Krebs oder Erkrankungen des zentralen Nervensystems, beteiligt. In Tabelle 1 ist eine kleine Auswahl humaner oder muriner ncRNAs aus verschiedenen Klassen mit ihren biologischen Funktionen aufgeführt.

Wie oben bereits erwähnt, wird nicht-kodierende RNA meist in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms, wie z. B. Introns proteinkodierender Gene, Introns nicht-proteinkodierender Gene und intergenischen Bereichen, kodiert. Sie können aber auch aus Exons nicht-proteinkodierender Gene stammen. (Mattick und Makunin, 2005)

Funktionell lassen sich ncRNAs grob in zwei Hauptgruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst RNA-Typen, die hauptsächlich an infrastrukturellen Prozessen in Zelle beteiligt sind. Diese Gruppe umfasst neben ribosomaler RNA (rRNA) und transfer RNA (tRNA) z. B. auch small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), small Cajal body-specific RNA (scaRNA), Telomerase RNA und Y RNA. Einige dieser RNA-Typen können, zusätzlich zu ihrer Beteiligung an infrastrukturellen Prozessen, auch regulatorische Vorgänge beeinflussen. In die zweite Gruppe fallen RNA-Typen, denen ausschließlich regulatorische Funktionen zugeordnet werden können. Hierzu gehören antisense RNA, natürliche cis-Antisense-Transkripte, long noncoding RNA, microRNA (miRNA), piwi-interacting RNA (piRNA), small interfering RNA (siRNA).

ncRNA	Länge (nt)	Organismus	Funktion
Air	108000	Mensch	Genomic Imprinting
BC 200	200	Mensch	Alzheimer Erkrankung
BC1/BC200	152/200	Maus, Mensch	Neuronale Entwicklung, Gehirnfunktion
BORG	2840	Maus	Knochendifferenzierung
KHPS1a	1290	Mensch	DNA Demethylierung
let- 7	21- 25	Mensch und andere	Embryonalentwicklung
miR-143	22	Mensch	Kolonkrebs
miR-196	22	Maus	Regulation von HOXB8 in der Embryoentwicklung
miR-375	22	Maus	Regulation der Insulinsekretion
NRSE dsRNA	20	Mensch	Neuronale Stammzellendifferenzie- rung
RIAN	5249	Maus	Genomic Imprinting
Xist	17000	Mensch	X Chromosom Inaktivierung
MBII-52	66	Maus	Regulation of 5HT _{2C} Rezeptorprozessierung

Tabelle 1:

Beispiele einiger ncRNAs, die an biologischen Prozessen beteiligt sind. (modifiziert nach: Costa, 2005):

1.2 NcRNAs mit infrastrukturellen Funktionen

1.2.1 Small nuclear RNA (snRNA)

SnRNAs sind RNA Moleküle, die im Zellkern vorkommen und weniger als 200 nt lang sind. SnRNAs können sowohl RNA Polymerase II (*pol II*) als auch Polymerase III (*pol III*) Transkripte sein. Sie sind uracilreich und besitzen eine 5' Cap-Struktur. SnRNAs bilden zusammen mit diversen Proteinen verschiedene snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein) Komplexe aus, die als Bestandteil des Spleisosoms an der Prozessierung der pre-mRNA beteiligt sind. (Alberts et al., 2008; Mattaj et al. 1993) Am Spleißen der meisten pre-mRNAs sind die snRNAs U1, U2, U4, U5 und U6 beteiligt. Es gibt aber auch Introns, die nur durch besondere Spleisosome prozessiert werden, die aus U11, U12, U4atac und U6atac snRNPs bestehen. (Patel und Steitz, 2003) Neben ihrer Beteiligung an Spleiß-Vorgängen könnten snRNAs auch regulatorische Funktionen besitzen. So kann z. B. U1 snRNA mit dem Transkriptionsfaktor TFIID assoziieren und die Initiation der Transkription beeinflussen. (Kwek et al., 2002)

1.2.2 Small nucleolar RNA (snoRNA)

SnoRNAs sind zwischen 60 nt und 300 nt lang, metabolisch stabil und liegen im Nukleolus vor. SnoRNAs lassen sich in zwei Klassen unterteilen, den so genannten C/D Box snoRNAs und den H/ACA Box snoRNAs. C/D Box snoRNAs zeichnen sich durch zwei konservierte Sequenzmotive aus, dem Box C Motiv RUGAUGA und dem Box D Motiv CUGA. Auch H/ACA snoRNAs enthalten konservierte Sequenzbereiche. Hierbei handelt es sich um das Box H Motiv ANANNA und um das ACA Element. Der strukturelle Kernbereich der snoRNAs wird in beiden Klassen durch die Lage der konservierten Sequenzbereiche bedingt. (Kiss, 2002) SnoRNAs können in unterschiedlicher Weise expriert werden. Sie können von snoRNA Genen mittels RNA Polymerase II transkribiert werden, oder sie liegen im Intron proteinkodierender Gene, die mittels RNA Polymerase II transkribiert werden. Die Gene, in deren Intron sich snoRNA Gene befinden, sind häufig sogenannte Housekeeping Gene. Intronische snoRNAs können auf zwei unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. Im ersten Fall wird das Intron durch Spleißen freigesetzt und die nicht zur snoRNA gehörenden Sequenzbestandteile werden anschließend durch Exonukleasen verdaut. Im zweiten Fall, der von untergeordneter Bedeutung ist, wird die

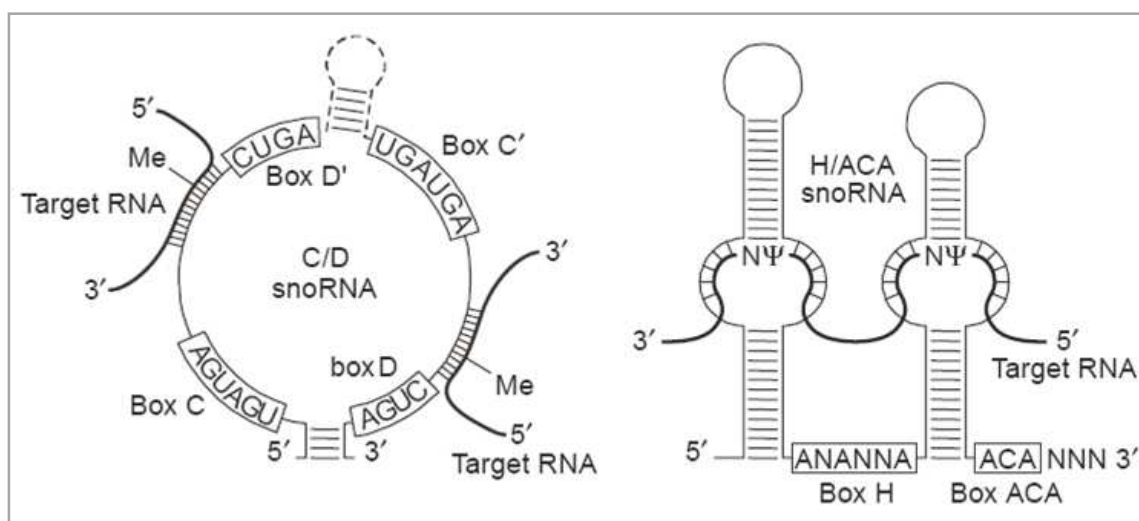


Abbildung 1:
molekulare Struktur der snoRNA Klassen (modifiziert nach: Filipowicz und Pogacić, 2002)

Seite | 17

Spleißen beteiligt und fungieren als Vorläufermoleküle in der miRNA Biosynthese. (Kishore und Stamm, 2006; Ender et al., 2008)

Während die meisten snoRNA Moleküle ubiquitär exprimiert werden, gibt es einige, die nur im Gehirn vorkommen. (Cavaillé et al., 2001) Diese gehirnspezifischen snoRNAs sind nicht an Modifizierungsvorgängen von rRNA oder snRNA beteiligt. (Rogelj, 2006) Über ihre genaue Funktion gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse. Man konnte jedoch bestimmten gehirnspezifischen snoRNAs funktionelle Eigenschaften zuordnen. So wird z. B. die gehirnspezifisch exprimierte snoRNA MBII-48 spezifisch in der frühen Phase der Gedächtnisbildung herunter reguliert, während die Expression von MBII-52, einer anderen snoRNA, steigt. Über MBII-52 weiß man außerdem, dass es am Alternativen Spleißen des Serotonin-Rezeptors 2C beteiligt ist. (Kishore und Stamm, 2006) Andere snoRNAs (HBII-13, HBII-52 und HBII-85) werden mit dem Prader-Willi-Syndrom, einer kindlichen Erkrankung, die mit geistiger Behinderung einhergeht und sich auf eine Deletion in Chromosom 15 zurückführen lässt, in Verbindung gebracht.

Außer snoRNAs findet man im Zellkern noch zwei weitere RNA Klassen mit ähnlicher Struktur bzw. Funktion. Hierbei handelt es sich um scaRNA (small Cajal body-specific RNA) und um Telomerase RNA.

ScaRNA ist strukturell und funktionell nicht von snoRNA zu unterscheiden, ist aber in Cajal Bodies lokalisiert. Bei den Cajal Bodies handelt es sich um nukleoplasmatische Organellen, die viele RNP Komplexe enthalten. Diese RNP Komplexe sind an der mRNA und rRNA Biosynthese und Modifikation beteiligt. Cajal Bodies scheinen an der Reifung und dem Zusammenlagern dieser Komplex beteiligt zu sein. (Richard et al., 2003; Bachellerie et al., 2002) Wie klassische snoRNA ist auch scaRNA an der Modifikation bestimmter snRNA Moleküle beteiligt. (Darzacq et al., 2002)

Telomerase RNA sind Bestandteile der Telomerase, einem Ribonukleoproteinkomplex, der Reverse-Transkriptase Aktivität besitzt und telomerische DNA Repeats an die Enden eukaryotischer Chromosomen anhängt. Telomerase RNA hat in diesem Komplex zum einen die Aufgabe, ein Gerüst für die Proteine zu bilden, zum anderen trägt sie die Sequenz, die in die telomerische DNA kopiert wird. In unterschiedlichen Organismen unterscheiden sich Telomerase RNAs in ihrer Länge und Struktur. In Wirbeltieren sind sie 382 bis 595 nt lang und tragen eine H/ACA snoRNA ähnliche Domäne. (Antal et al., 2002; Theimer und Feigon, 2006)

1.2.3 Y RNA

Y RNAs sind zwischen 80 und 300 nt lange, nicht-kodierende RNA Moleküle. Ursprünglich wurden sie als RNA Komponenten eines RNP Komplexes, dem Ro RNP, identifiziert. Dieser Komplex kann aus dem Serum von Patienten isoliert werden, die an Systemischem Lupus Erythematosus, einer Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, leiden. Ro RNP besteht aus einer Y RNA und den autoimmunantigenen Proteinen Ro60 und La, sowie weiteren nicht näher charakterisierten Proteinen. Y RNAs konnten bislang in allen untersuchten Wirbeltieren und *Caenorhabditis elegans*, nicht aber in Insekten, Pflanzen und Hefen nachgewiesen werden. Y RNA Gene werden mittels RNA Polymerase III transkribiert. Sie liegen evolutionär konserviert vor, wobei sich die Anzahl verschiedener Y RNAs zwischen einzelnen Arten unterscheidet. (Pruijn et al., 1993) In humanen Zellen findet man vier unterschiedliche Y RNA Moleküle hY1, hY3, hY4 und hY5. Über die Funktion des Ro RNPs und der Y RNAs ist wenig bekannt. Ro60 Protein ist an der Qualitätskontrolle von RNA Molekülen beteiligt. Es kann kleine, falsch gefaltete RNAs binden. Da Y RNA das Binden dieser falsch gefalteten RNA an Ro sterisch blockiert, wird angenommen, dass es die Aufgabe der Y RNA ist, den Zugang dieser RNA Moleküle an das Ro Protein zu regulieren. (Stein et al., 2003; Chen et al., 2003) Neben dieser Aufgabe ist Y RNA auch an der semikonservativen Replikation von DNA maßgeblich beteiligt. Ein genauer Mechanismus konnte hierfür aber noch nicht aufgeklärt werden. Sicher ist jedoch, dass an diesem Prozess keine Bindung der Y RNA an Ro60 erforderlich ist. (Christov et al., 2006) Außerdem scheint Y RNA auch an der Steuerung der Zellproliferation beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Y RNAs in soliden Tumoren stärker exprimiert werden, als in gesundem Gewebe und dass ein Abbau von hY1 bzw. hY3 zu einer zytostatischen Hemmung der Zellproliferation führt. (Christov et al., 2008) Während der Apoptose wird Y RNA in einem Caspase- abhängigen Mechanismus schnell und spezifisch degradiert. (Rutjes et al., 1999)

1.3 Regulatorische ncRNA Klassen

1.3.1 Micro RNA (miRNA)

Bei microRNAs handelt es sich in der Regel um 20 bis 22 nt lange einzelsträngige RNA Moleküle. Sie treten gewebe- und zeitspezifisch auf und können aus Pflanzen, Tieren, und Viren isoliert werden. In verwandten Organismen findet man miRNAs häufig konserviert vor. Bis heute wurden ungefähr 9000 miRNAs in Tieren, Pflanzen und Viren identifiziert und in Datenbanken, wie miRBase abgelegt (Griffiths-Jones, 2008) Mittels bioinformatischer Methoden konnte jedoch ermittelt werden, dass in Organismen etwa 1 - 5% der gesamten Genmasse proteinkodierender Gene auf microRNA Gene entfallen.

MiRNAs haben verschiedene Funktionen im Organismus. Belegt ist ihr Einfluss auf Differenzierungsvorgänge in Zellen und Geweben, auf die Entstehung von Tumoren und anderen pathologischen Veränderungen.

Biosynthese:

MicroRNA Gene werden mittels RNA Polymerase II Enzyme (*pol II*) transkribiert. Für einige dieser Gene wurde ein eigener *pol II* Promotor identifiziert. (Lee et al., 2004) MiRNA Gene können einzeln oder auch in Genclustern vorkommen. Die Produkte der Transkription sind primäre miRNAs (pri-miRNA). Pri-miRNAs sind in der Regel über 1 kb lang. Sie können gespleißt und zusätzlich mit einer m⁷G-Cap-Struktur am 5' Ende und einem Polyadenosin-Schwanz am 3' Ende versehen sein. (Cai et al., 2004) Pri-miRNA faltet sich zu haarnadelförmigen Vorläufermolekülen und werden von einem Proteinkomplex, der neben Drosha, einer RNase III Endonuklease, auch den Kofaktor Dgcr8/Pasha, einem Protein das zwei Doppelstrang RNA Bindungsdomänen besitzt, gebunden. Dgcr8 bindet die Haarnadel und Drosha schneidet sie unsymmetrisch und spezifisch an der Basis, so dass eine 60 bis 70 nt lange Haarnadelstruktur entsteht, die am 5' Ende ein Phosphat und am 3' Ende einen zwei Nukleotide langen Überhang besitzt. Diese Struktur wird als pre-miRNA bezeichnet. (Zhang et al., 2007) Neben pri-miRNAs können auch gespleißte Introns als pre-miRNA Vorläufer dienen. Man bezeichnet solche Introns als „Mirtrons“. (Berezikov, et al., 2007) Pre-miRNAs werden über Exportin-5, einem Ran-GTP abhängigen Transportrezeptor, aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch Dicer, einer weiteren RNase III Endonuklease, weiter prozessiert. Dicer schneidet aus der pre-miRNA Vorläuferstruktur einen 20 bis 22 nt langen miRNA:miRNA* Doppelstrang heraus, der am 5' Ende ein

Phosphat und am 3' Ende einen Überhang aus zwei Nukleotiden besitzt. Dieser Doppelstrang wird anschließend durch eine Helikase entwunden. Der miRNA* Strang wird abgebaut und der reife miRNA Strang in einen Ribonukleoprotein Komplex aufgenommen, der RNA-induced silencing complex (RISC) genannt wird. (Bartel, 2004) Hauptbestandteile dieses Komplexes sind neben der RNA, Argonaut-Proteine. Es können aber noch weitere Proteine komplexiert sein. Die Prozessierung der pre-miRNA und die Zusammenlagerung des RISC sind funktionell eng miteinander verbunden. In humanen Zellen konnte Dicer, TRBP (human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) und Argonaut-2 Protein (Ago2) als ein Komplex aufgereinigt werden. In diesem Komplex findet sowohl die Bindung der pre-miRNA durch TRBP, die pre-miRNA Prozessierung durch Dicer, die Auswahl des reifen miRNA Stranges und die Inhibition der Ziel-RNA durch Ago2 statt. (Gregory, 2005) In Abbildung 2 sind die einzelnen Schritte der miRNA Biosynthese schematisch zusammengefasst.

MiRNA-vermittelte Genregulation:

MiRNAs gelten heute als einer der wichtigsten Faktoren in der Regulation der Genexpression. Es wird geschätzt, dass etwa 30% aller proteinkodierender Gene durch miRNA kontrolliert werden. Die Regulation erfolgt auf der posttranskriptionale Ebene durch Abbau oder Inhibition der mRNA. In Pflanzen wird diese Art der Regulation deshalb als Posttranskriptional Gene Silencing (PTGS) bezeichnet. In Tieren haben sich die Begriffe RNA Interferenz (RNAi) bzw. RNA silencing durchgesetzt.

Es wurden bislang drei Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation beschrieben, die mRNA Degradation, die Unterdrückung der Translation und der miRNA-vermittelte mRNA Abbau.

Bei der mRNA Degradation liegt eine nahezu vollständige Komplementarität zwischen miRNA und mRNA vor. Eine vollständig komplementäre Basenpaarung führt zum endonukleolytischen Zerschneiden der mRNA. Die mRNA Degradation findet man vor allem in Pflanzen, es gibt aber auch wenige tierische miRNAs, z. B. miR-127, miR-136, miR-196, miR-431, miR-433-3p, miR-433-5p, miR-434-3p und miR-434-5, die diesen Mechanismus nutzen. (Du und Zamore, 2005; Yekta et al., 2004)

In Metazoen bindet miRNA in der Regel nicht vollständig komplementär an ihrer Ziel-mRNA. Die mRNA wird in diesem Fall nicht endonukleolytisch abgebaut, vielmehr kommt es zu einer Unterdrückung der mRNA Translation. Für das Unterdrücken der mRNA Translation genügt eine vollständig komplementäre Bindung der Nukleotide zwei

bis acht der miRNA an die 3' UTR (untranslated Region) der mRNA. Diese 6 nt lange miRNA Sequenz wird auch „seed“ Region genannt. Ausgehend von der Bindung der „seed“ Region an die mRNA werden zwei unterschiedliche Mechanismen der Translationsunterdrückung diskutiert. Zum einen die Blockierung der Initiation der Translation durch die Unterdrückung der Erkennung der Cap-Struktur, zum anderen die Unterdrückung der Elongation durch ein Abfallen der Ribosome.

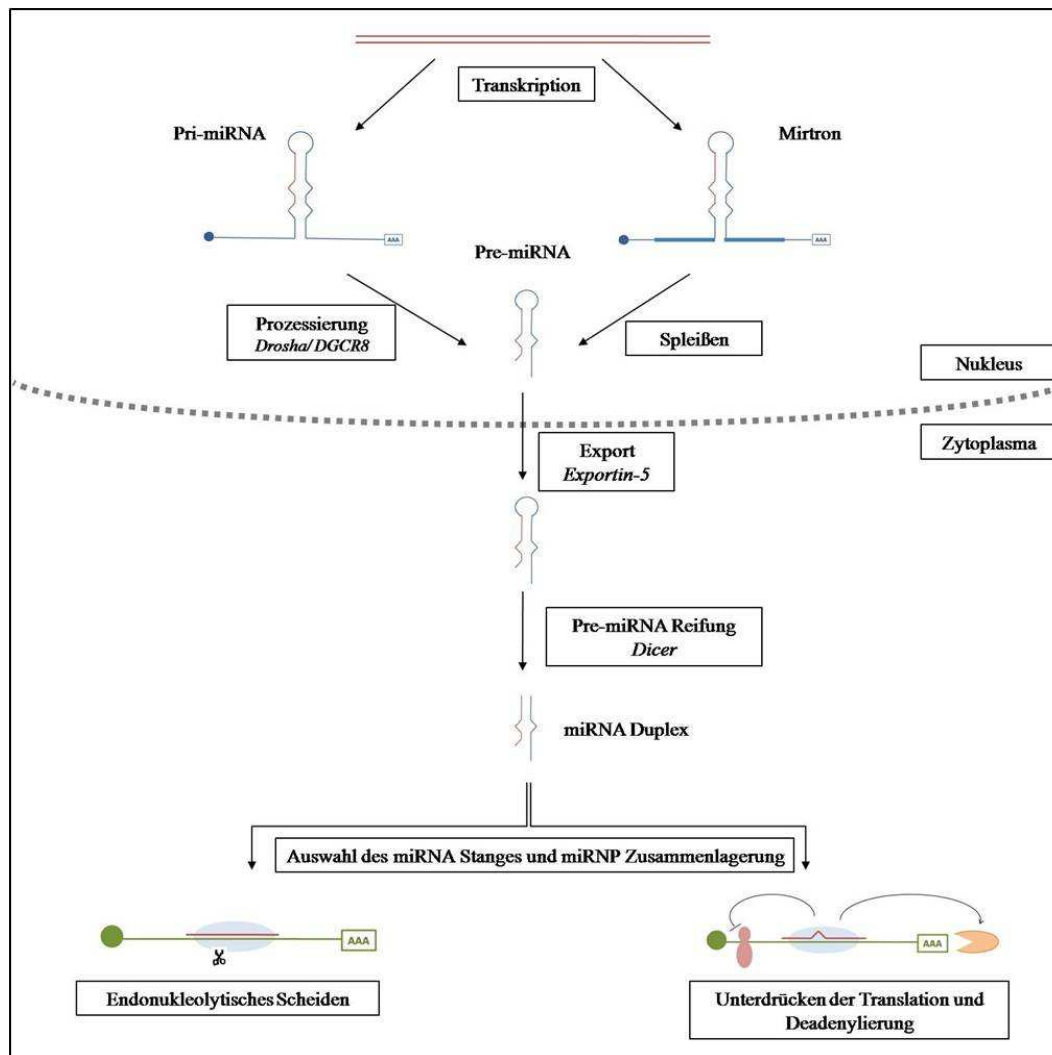


Abbildung 2:

miRNA Biosynthese und miRNA-vermittelte Genregulation (modifiziert nach: Filipowicz et al., 2008)
 Zellkern: Transkription der miRNA kodierenden Gene. Aus pri-miRNA entsteht pre-miRNA durch Prozessierung mit Drosha. Aus Mirtrons entsteht pre-miRNA durch Spleißen. Der Export der pre-miRNA aus dem Zellkern erfolgt über den Transportrezeptor Exportin-5.

Zytoplasma: Im Zytoplasma findet die Reifung der pre-miRNA zum miRNA Duplex statt. Hieran ist maßgeblich die RNase III Endonuklease Dicer beteiligt. Anschließend erfolgt die Auswahl des reifen miRNA Stranges und die Zusammenlagerung des RISC Komplexes. Die Genregulation erfolgt entweder bei vollständig komplementäre Bindung durch ein endonukleolytisches Schneiden von mRNA oder bei nicht vollständiger Komplementarität durch Unterdrücken der Translation oder durch Destabilisierung der mRNA durch beschleunigte Deadenylierung.

Beim dritten Mechanismus, dem miRNA-vermittelte mRNA Abbau, führt die miRNA Bindung zur Destabilisierung der mRNA durch eine beschleunigte Deadenylierung. Der Verlust des Poly(A)-Schwanzes stellt den initialen Schritt dieses Prozesses dar, auf den der Abbau der mRNA Moleküle folgt. (Filipowicz et al., 2008)

Unter bestimmten Bedingungen können miRNAs die Genregulation aber nicht nur inhibitorisch, durch RNA Interferenzmechanismen, regulieren, sondern durch Aktivierung der Translation auch stimulatorisch wirken. (Vasudevan et al., 2007)

1.3.2 Short Interfering RNA (siRNA)

Short interfering RNAs (siRNA) gehören, genau wie miRNA, zur Klasse der regulatorischen RNA. Wie diese sind sie Regulatoren der Genexpression. In der Regel ist siRNA 20 bis 25 nt lang, einzelsträngig und wird durch Dicer prozessiert. Im Gegensatz zu miRNA wird sie nicht aus haarnadelförmigen Vorläufermolekülen, sondern aus langen RNA Doppelsträngen prozessiert. Reife siRNA Moleküle werden in den RISC aufgenommen. Dieser Ribonukleinsäure-Protein Komplex bindet komplementär an die mRNA und schneidet diese endonukleolytisch. (Bartel, 2004) Im Gegensatz zu miRNAs können siRNAs die Genexpression nicht nur auf posttranskriptionaler Ebene, sondern auch durch epigenetische Veränderungen, wie z.B. DNA-Methylierung, auf transkriptionaler Ebene beeinflussen. (Matzke, et al., 2004; Aufsatz, 2002). Dieser Mechanismus konnte bislang ausschließlich in Pflanzen beobachtet werden, eine Übertragbarkeit auf Säugetiere wird aber diskutiert. (Weinberg et al., 2006; Morris, 2008)

„Klassische“ siRNA ist exogenen Ursprungs, wobei es sich um künstlich erzeugte Moleküle oder RNA viraler Herkunft handelt. Synthetisch erzeugte siRNA wird heute in der molekularbiologischen Forschung häufig als Werkzeug verwendet, um die Genexpression bestimmter Zielgene zu hemmen oder auszuschalten.

Neben exogener siRNA sind aber auch unterschiedliche Gruppen endogenen Ursprungs bekannt. Diese werden natsiRNA (natural antisense siRNA), tasiRNA (endogenous trans-acting siRNA), scnRNA (small scan RNA) und tncRNA (tiny non-coding RNAs) genannt. (Farazi et al., 2008) Endogene siRNA konnte bislang nur in Pflanzen und in Nematoden identifiziert werden.

TasiRNA ist 21 nt lang und leitet sich von langen, einzelsträngigen, primären Transkripten ab, die durch spezifische miRNAs zerschnitten werden. Die geschnittenen Transkripte werden von RNA-abhängiger RNA Polymerase in einen Doppelstrang überführt, der dann von Dicer weiterprozessiert wird. (Yoshikawa et al., 2005)

NatsiRNA leitet sich von Paaren natürlicher cis-Antisense-Transkripte ab. Bislang wurde nur ein Beispiel einer natsiRNA näher untersucht. Es sind jedoch ähnliche RNA Moleküle bekannt, die sich aus Paaren natürlicher cis-Antisensetranskripte ableiten lassen. Gemeinsam ist allen natsiRNA Molekülen, dass sie nur unter induzierbaren Bedingungen, wie z. B. abiotische Stress, gebildet werden. (Borsani et al., 2005)

ScnRNA wurde bislang nur in Protozoen identifiziert. Mit 26 nt ist sie länger als miRNA, entsteht aber auch in einem Dicer-abhängigen Mechanismus. Sie reguliert die Genexpression über Modifikation des Chromatins. (Kim, 2005)

Als TcnRNAs bezeichnet man kleine ncRNAs, die in *Caenorhabditis elegans* identifiziert wurden. Sie sind 22nt lang und leiten sich von nicht konservierten Sequenzen ab. Über ihre Vorläufermoleküle, Biosynthese und Funktion ist bislang noch nichts bekannt. Deshalb ist nicht klar, ob es sich bei tncRNAs tatsächlich um eine eigenständige RNA-Klasse handelt. (Ambros et al., 2003)

Neben siRNAs gibt es zwei Klassen kleiner interferierender RNA, die sich in ihren Eigenschaften von den bislang beschriebenen siRNAs Gruppen deutlich unterscheiden. Hierbei handelt es sich um piRNA (piwi-interacting RNA) bzw. rasiRNA (repeat associated siRNA) und smRNAs (small modulatory RNAs).

1.3.3 Piwi-interacting RNA (piRNA)

PiRNA ist 24 bis 30nt lang. Ihre Biosynthese unterscheidet sich deutlich von der, anderer interferierender RNA. Auf Grund ihrer Länge wird für ihre Biosynthese ein von der RNase III Endonuklease Dicer unabhängiger Prozess postuliert. Sie interagieren mit Proteinen, die eine Untergruppe der Argonaut-Proteine darstellen und mit Piwi-Protein (P-element induced wimpy testis) verwandt sind. (Klattenhoff und Theurkauf, 2008) In *Drosophila melanogaster* sind dies Piwi, Aubergine (Aub) und Argonaute-3 (Ago3), in Säugern sind es die Piwi-Proteine Mili, Miwi und Miwi2. (Brennecke et al., 2007; Aravin et al., 2006) Einige piRNAs stammen von Transposons oder Repeat Elementen ab, was

ihnen auch die Bezeichnung rasiRNA einbrachte. Heute weiß man jedoch, dass piRNA sowohl von Repeat Elementen, als auch von komplexen DNA Sequenzen abstammen können. (Aravin et al., 2003) Man betrachtet deshalb rasiRNA als eine Untergruppe der piRNA. RasiRNA kann man hauptsächlich in Insekten finden, während piRNA, die sich von anderen DNA Sequenzen ableitet, auch in Säugetieren nachgewiesen wurden.

Biosynthese

Der Biosynthesemechanismus der piRNAs ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass sich häufig auftretende piRNAs vom Antisense-Strang bestimmter Retrotransposonsequenzen ableiten und dass sie mit den Argonaut-Proteinen Piwi und Aub assoziiert vorliegen. Im Gegensatz dazu sind Sense-Strang piRNAs mit Ago3 assoziiert. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurde ein so genanntes Ping-Pong Modell (Abb. 3) als Biosynthesemechanismus entwickelt. Ago3 bindet den Sense-Strang und leitet das Schneiden des antisense Transkriptes ein. Es entsteht das 5' Ende der Antisense-Strang piRNA. Hieran bindet Piwi und Aub, was zum Prozessieren der antisense piRNA auf die endgültige Länge führt. Der Komplex aus Aub und antisense piRNA bindet anschließend an das Sense-Transkript und führt zu dessen finalen Prozessierung zur reifen Sense-Strang piRNA. (Brennecke et al. 2007) Das Ping-Pong Modell gilt bislang nur in *D. melanogaster*, es gibt jedoch Erkenntnisse, dass ähnliche Mechanismen auch in Säugetieren zum Tragen kommen könnten. (Aravin et al., 2007)

In Säugetieren stammen piRNAs, wie oben bereits erwähnt, in der Regel nicht von Repeat Elementen ab, sondern von primären Transkripten, die einen definierten genomischen Ursprung haben. Man kann ein komplexes Gemisch zehntausender reifer piRNAs nachweisen, die sich aber nur von wenigen hundert primären Transkripten ableiten lassen. Da viele piRNAs, obwohl sie sich vom selben primären Transkript ableiten, teilweise in ihrer Sequenz überlappen, wird ein Biosynthesemechanismus diskutiert, bei dem es zu einer zufälligen Verteilung reifer piRNAs kommt. (Betel et al., 2007) Dies könnte der Grund sein, warum reife piRNA in unterschiedlichen Säugetieren nicht konserviert vorliegt, die Regionen im Genom, von denen sie abstammt, jedoch konserviert ist.

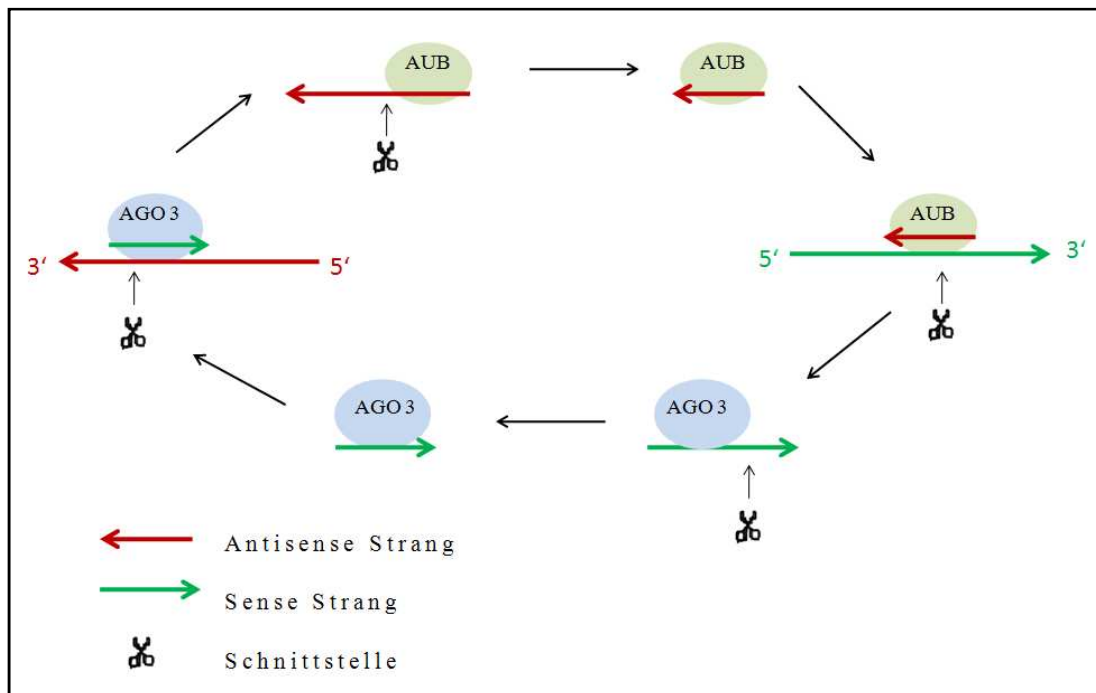


Abbildung 3:

Ping-Pong-Modell der piRNA Biosynthese (modifiziert Klattenhoff und Theurkauf, 2008)

Ago3 bindet an die Sense-Strang piRNA und leitet das Schneiden des Antisense-Transkriptes ein. Es entsteht das 5' Ende der Antisense-Strang piRNA. Hieran bindet Piwi (nicht dargestellt) und Aub, was zur Prozessierung der antisense piRNA auf die endgültige Länge führt. Der Komplex aus Aub und antisense piRNA bindet anschließend an das Sense-Transkript und führt zu dessen finalen Prozessierung zur reifen Sense-Strang piRNA.

Biologische Funktion

Die Zielstrukturen und der Mechanismus der piRNA basierten Genregulation konnte noch nicht aufgeklärt werden. Studien, vor allem Knockout Experimente, in denen Piwi-Proteine ausgeschaltet wurden, konnten zeigen, dass piRNAs entscheidend für die Keimbahnentwicklung in Drosophila, Maus und Zebrafisch sind. (Klattenhoff und Theurkauf, 2008) So wird durch einen Knockout eines der murinen Piwi-Proteine, Mili, Miwi oder Miwi2, die in den Hoden männlicher Mäuse vorkommen, die Spermatogenese unterbunden. Mili und Miwi2 Mutanten zeigten außerdem Phänotypen, die auf eine Rolle der piRNA in der Transposonregulation hinweisen. (Carmell et al., 2007) Mutationen in Gene des piRNA Signalweges in Drosophila führen zu einem transkriptionalen Silencing Mechanismus, der durch das Ausbreiten von Heterochromatin von perizentromerischen zu telomerischen Regionen verursacht wird. (Pal-Bhadra et al., 2004) Es wird daher diskutiert, ob piRNAs die Genregulation durch das Zusammenlagern von Heterochromatin

steuern könnten oder ob der Komplex aus piRNA und Argonaut-Proteinen sich an Heterochromatin anlagert und dort entstehende Transkripte abgebaut werden. Da Piwi-artige Proteine nicht nur in der Keimbahn, sondern auch in somatischen Zellen vorkommen, und da sie sowohl nuklear als auch zytoplasmatisch auftreten, ist es denkbar, dass piRNA auch reife mRNA im Zytoplasma als Zielstruktur haben könnte und neben den bereits beschriebenen, noch eine Reihe anderer Funktionen, z. B. während der Entwicklung höherer Organismen, besitzen könnten.

1.3.4 Small modulatory RNA

Jüngst wurde ein weiterer RNA Typ charakterisiert, die kleine modulatorische RNA (smRNA). Bei ihr handelt es sich um eine etwa 20 nt lange, doppelsträngig RNA, die eine wichtige Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielt. Der einzige bislang bekannte Vertreter ist NRSE dsRNA. NRSE dsRNA enthält die Sequenz des Neuron restrictive silencer element NRSE/RE1. NRSE/RE1 ist innerhalb einer großen Bandbreite von Genen exprimiert, die die Entwicklung und Funktion von Neuronen beeinflussen, wie zum Beispiel Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren. Der Transkriptionsfaktor NRSF/REST (neuronal restricted silencing factor/RE1 silencing transcription factor), ein übergeordneter Regulator von NRSE/RE1 unterdrückt als negativer Transkriptionsfaktor die neuronale Genexpression. Durch Interaktion von NRSE dsRNA mit der NRSF/REST Transkriptionsmaschinerie wird die Expression von Neuronen-spezifischen Genen in der frühen Neuronalentwicklung aktiviert. Auf diese Weise wird die Expression von neuronalen Genen in Stammzellen von einem unterdrückten Zustand zu einem aktiven Zustand in frühen Neuronen verschoben.

Ihre Biosynthese und der Mechanismus mit dem smRNAs in die Genexpression eingreifen, muss noch untersucht werden. Es scheint sich aber um eine dsRNA/Protein Interaktion und nicht um einen klassischen RNAi Mechanismus zu handeln. (Kuwabara et al., 2004)

1.4 Frühe Embryonalentwicklung und Embryonale Stammzellen

1.4.1 Frühe Embryonalentwicklung

Die frühe Embryonalentwicklung beginnt mit den ersten Zellteilungen der Zygote. Schon im achtzelligen Morula-Stadium lässt sich eine Kompaktierung und eine erste Gliederung der Zellen erkennen. Während der Mausembryogenese liegt am zweiten Tag nach der Befruchtung (E2,5) eine vollständig entwickelte 16-Zell Morula vor, am dritten Tag (E3,5) hat sich der Embryo in ein 32-Zellstadium, der Blastozyste, weiter entwickelt. Aus den inneren Zellen der Morula hat sich die innere Zellmasse (ICM), auch Embryoblast genannt, gebildet. Die äußeren Zellen haben sich zum Trophoblast umgeformt. Das Innere der Blastozyste hat sich mit Flüssigkeit gefüllt, so dass sich ein Hohlraum bildet, der auch Blastozystenhöhle oder Keimblase genannt wird. Im späten Blastozystenstadium (E4,5) bildet sich aus Zellen der ICM an der Grenze zur Blastozystenhöhle das primitive Endoderm bzw. der Hypoblast. Aus dem Teil des Embryoblast, der dem Trophoblast anliegt, bildet sich das embryonale Ektoderm bzw. der Epiblast. Am fünften Tag (E5) folgt die Implantation der Blastozyste in die Gebärmutterschleimhaut. Nach der Implantation (E6) besteht der Embryo also aus drei charakteristischen Zellschichten, dem Trophoblast, dem Hypoblast und dem Epiblast. An die Implantation schließt sich die Gastrulation (E6,5) an. Aus dem Epiblast entstehen die drei primären Keimblätter: Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus diesen Keimblättern bildet sich in der weiteren Entwicklung der Körper des Embryos. Aus dem Hypoblast entwickeln sich das viszerale und das parietale Endoderm, aus denen sich der Dottersack bildet. Der Trophoblast formt zusammen mit dem Epithel des Uterus den Syncytiotrophoblast aus, der sich zur Plazenta weiterentwickelt. (NIH Stem Cell Report, 2001; O'Shea, 2004)

1.4.2 Embryonale Stammzellen und Pluripotenz

Stammzellen haben im Gegensatz zu differenzierten Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren. Man unterscheidet zwischen multipotenten Stammzellen, die nur zu einem oder mehreren speziellen Zelltypen differenzieren können, pluripotenten Stammzellen, die sich keimblattübergreifend zu allen Zelltypen des Organismus differenzieren können und totipotenten Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen einen vollständiger Organismus aufzubauen.

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) können aus Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste vor der Implantation isoliert werden. Zum ersten Mal gelang dies 1981 am Mausmodell (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981). ES Zellen sind pluripotente Stammzellen und haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Wie alle pluripotenten Zellen können ES Zellen in die unterschiedlichen Zelltypen differenzieren, die aus den drei primären Keimblättern hervorgehen. (NIH Stem Cell Report, 2001) Darüber, ob eine ES Zelle ihren Stammzellcharakter behält oder die Differenzierung in einen bestimmten Gewebetyp eingeleitet wird, entscheidet ein noch nicht vollständig entschlüsseltes Netzwerk aus Regulatoren und Signalwegen. Die wichtigsten Faktoren, die den Erhalt des Stammzellcharakters und die Einleitung der Differenzierung von ES Zellen steuern, sind LIF (leukemia inhibition factor), Bmp (bone morphogenetic protein), Wnt (wingless type) Protein, Fgf (fibroblast growth factor) und die Transkriptionsfaktoren Oct3/4 und Nanog.

LIF ist ein Zytokin, das zur Familie der Interleukin-6 (Il-6) Zytokine gehört. LIF bindet an einen Rezeptor, der aus einer LIF spezifischen Untereinheit LIFR β und einer Signalübermittlereinheit gp130 besteht. Über die Rezeptorbindung können zwei nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden, zum einen der Jak-Stat (Janus Kinase- signaltransducer and activator of transcription) Signalweg, zum anderen der Shp2-ERK (SH2 domain- containing tyrosine phosphatase) Signalweg. Für den Erhalt der Pluripotenz ist die Aktivierung des Jak-Stat Signalwegs wichtig, wobei Stat3 eine Schlüsselposition in der Regulation einnimmt. (Niwa, 2001) Es konnte gezeigt werden, dass eine von LIF unabhängige Aktivierung von Stat3 ausreicht, die Selbsterneuerung von ES Zellen aufrecht zu erhalten. (Matsuda et al., 1999) Der ERK Signalweg hat keinen direkten Einfluss auf die Selbsterneuerung von Stammzellen, kann aber die Regulation über den Jak-Stat Signalweg modulieren. Interessanterweise wirkt LIF in ES Zellen nur in Kombination mit fötalem Kälberserum und hat in humanen ES Zellen keinen Einfluss auf Selbsterneuerung und Pluripotenz. Auch gibt es keinen Hinweis darauf, dass LIF *in vivo* für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in der ICM benötigt wird. (Niwa, 2001) In LIF, LIFR β , gp130 und Stat3 Knockout Mäusen konnte eine normale Entwicklung des Embryos bis zum Ei-Zylinder-Stadium beobachtet werden. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass neben LIF/Stat3 noch weitere Faktoren für das Aufrechterhalten der Pluripotenz notwendig sind. Einer dieser Faktoren ist Bmp (bone morphogenetic protein). In serumfreien Medium hält eine Kombination von Bmp2 bzw. Bmp4 und LIF die Selbsterneuerung von ES Zellen aufrecht und verhindert die Differenzierung. Jedoch ist die Bmp-Wirkung von der Anwe-

senheit von LIF abhängig. Ist kein LIF vorhanden, führt Bmp zu einer starken Induktion der mesodermalen Differenzierung und verhindert die neuronale Differenzierung. (Ying et al., 2003)

Auch Wnt (wingless type) Protein kann den Status von ES Zellen regulieren, wobei kontrovers diskutiert wird, ob eher der Erhalt der Pluripotenz oder die Einleitung der Differenzierung im Mittelpunkt des Wnt Signalweges steht. Während Sato et al. zeigen konnten, dass es durch eine Aktivierung des Wnt Signalweges zu einer Aufrechterhaltung der Pluripotenz in humanen und murinen ES Zellen kommt, konnten Dravid et al. nur eine verstärkte Proliferation der ES Zellen unter diesen Bedingungen feststellen. (Sato et al., 2004; Dravid et al., 2005) Eine mögliche Erklärung, warum durch die Aktivierung des Wnt Signalweges sowohl die Pluripotenz erhalten, als auch eine Differenzierung von ES Zellen vorangetrieben werden kann, könnte in einem Zusammenspiel aus einer Proliferationssteigerung, bedingt durch die Aktivierung des Wnt Signalweges, und anderen Faktoren liegen, die entweder die Differenzierung einleiten oder den Erhalt des Stammzellcharakters unterstützen. (Dravid et al., 2005)

Neben den bisher beschriebenen extrinsischen Faktoren kann der Stammzellzustand durch weitere Signalmoleküle beeinflusst werden, hierzu zählen z.B. Fgf (fibroblast growth factor), Insulin und Tgf- β /Aktivin. In humanen ES Zellen, bei denen die Regulation des Pluripotenzerhaltes von LIF unabhängig ist, scheint die Pluripotenz mittels einer Kombination aus dem Fgf Signalweg und einem ausgeglichenen Verhältnis von Tgf- β /Aktivin Signal zu Bmp Signal gesteuert zu sein. (Ohtsuka et al., 2008)

Neben extrinsischen Signalen werden zur Regulation der ES Zellen auch Transkriptionsfaktoren benötigt. Oct3/4 ist hiervon der am besten untersuchte. Man findet Oct3/4 ausschließlich in totipotenten und pluripotenten Zellen. Als wichtiger Regulator der frühen Embryonalentwicklung wird Oct3/4 in Oozyten, in der ICM, im primitiven Ektoderm, in Embryonen vor der Implantation, in den Urkeimzellen und in ES Zellen exprimiert. (Niwa, 2001) Häufig interagiert Oct3/4 mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren, wie Sox2 (sry related factor) und FoxD3 (forkhead family member D3). Je nach Kooperationspartner kann Oct3/4 die Expression verschiedener ES zellspezifischer Gene positiv oder negativ regulieren. Zu den bereits bekannten Genen zählen unter anderem *Fgf4* (fibroblast growth factor 4), *Utf1* (undifferentiated cell transcription factor 1) und *Zfp42/Rex1* (zinc finger protein 42). (Rao, 2004) Über die Funktion dieser Gene in der embryonalen Entwicklung ist nur wenig bekannt, allerdings konnte ein Einfluss von Oct3/4 in der Embryogenese nachgewiesen werden. In Embryonen, denen Oct3/4 fehlt, verlieren die

Zellen der ICM ihre Pluripotenz und entwickeln sich zu Zellen des Trophoektoderm. (Nichols et al., 1998) Wichtig für den Pluripotenzerhalt ist ein optimaler Spiegel von Oct3/4. Während es bei einem Überschuss an Oct3/4 zur Differenzierung in endodermales und mesodermales Gewebe kommt, führt eine Verringerung des optimalen Spiegels zur Bildung von Trophoektoderm. (Niwa et al. 2000)

Vor wenigen Jahren wurde mit Nanog ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für den Pluripotenzerhalt identifiziert. Nanog ist ein Protein, das eine Homeodomäne besitzt, in der Morula, der ICM und in ES Zellen exprimiert und nach der Implantation herunterreguliert wird. Die genaue Funktion von Nanog ist bislang nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass große Mengen an Nanog in ES Zellen die Pluripotenz aufrechterhalten können. Ein Herunterregulieren von Nanog dagegen kann, sowohl in murinen, als auch in humanen ES Zellen, eine Differenzierung zu außerembryonalen Zelltypen einleiten. (Pan et al., 2007)

1.4.3 Differenzierung von ES Zellen und Entwicklung neuronaler Zellen

ES Zellen können sich, wie oben bereits beschrieben, in alle Zelltypen differenzieren, die von den drei primären Keimblättern abstammen. So können sich aus ES Zellen, je nach Kulturbedingung, z.B., kardiale (Wobus et al., 1991), neuronale (Okabe et al., 1996), hämatopoetische (Schmitt et al., 1991), epitheliale (Bagutti et al., 1996) und endodermale Zelltypen (Sauer et al., 1998) bilden. In welche Richtung die Differenzierung erfolgt, hängt von einem komplexen Gemisch verschiedener Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen und extrazellulären Matrixproteinen ab. (Czyz und Wobus, 2001) *In vitro* werden murine ES Zellen in Anwesenheit von LIF kultiviert, um ihre Differenzierung zu verhindern; in Abwesenheit von LIF verlieren sie ihren Stammzellcharakter und differenzieren spontan in unterschiedlichen Zelllinien. In Suspension bilden ES Zellen spontan dreidimensionale kugelförmige Aggregate aus, die Embryonic Bodies (EB) genannt werden. EBs enthalten sowohl endodermales, mesodermales und ektodermales Gewebe. In ihrer Größe, Struktur und ihrer Fähigkeit zu differenzieren gleichen sie frühen Embryonen. Deshalb werden sie als *in vitro* Modell der frühen Embryonalentwicklung verwendet. Aus ES Zellen bilden sich nach zwei bis vier Tagen in Suspension einfache EBs mit einer Morula-ähnlichen Struktur. Am vierten bis fünften Tag in Kultur kann man zwei Gewebeschichten, eine innere ektodermale und eine äußere endodermale Schicht, sowie einen

Hohlraum, der von der endodermalen Schicht umschlossen wird, erkennen. Solche EBs werden zystische EBs genannt und ähneln in ihrem Aufbau einem Embryo im Blastozysten- oder Ei-Zylinder-Stadium. (Kurosawa, 2007) Die Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur ist ein wichtiger Auslöser für die weitere Differenzierung der EBs. Die innere Beschaffenheit eines EB, seine Größe und Interaktionen zwischen einzelnen Zellen, beeinflussen die Differenzierung in die unterschiedlichen Zelllinien entscheidend. So kann es durch eine Heterogenität, sowohl zwischen einzelnen EBs, als auch innerhalb eines EB, zu einer Verschiebung der Differenzierung von der einen zu einer anderen Zelllinie kommen. (O'Shea, 2004) Durch Anpassung der Kulturbedingungen und Zugabe bestimmter extrazellulärer Faktoren kann die Differenzierung der EBs in eine bestimmte Richtung gelenkt werden. So wird z. B. durch die Zugabe von Retinolsäure konzentrationsabhängig die neuronale Differenzierung eingeleitet. (Guan et al., 2001)

Allgemein gehen Zellen mit neuronalem Charakter aus dem Neurektoderm hervor. Im Mausembryo bildet es sich in der zweiten Woche nach der Befruchtung. Die biochemischen Vorgänge, die zur Ausbildung des Neurektoderms führen, finden kurz vor oder während der Gastrulation statt. Die Induktion der neuronalen Differenzierung wird durch verschiedene biochemische Signalwege reguliert. So führt eine Inhibition von Bmp und Wnt, sowie eine Aktivierung von Fgf, zur Ausbildung des Neurektoderms. (Zhang, 2006; Cazillis et al., 2006)

In vitro können ES Zellen zu einem geringen Prozentsatz spontan zu Zellen mit neuronalem Charakter differenzieren. Durch Zugabe einer hohen Konzentration Retinolsäure wird die Induktion der neuronalen Entwicklung signifikant erhöht. Der Mechanismus, durch den Retinolsäure die neuronale Differenzierung steuert, ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte jedoch eine direkte Interaktion zwischen Retinolsäure und dem Fgf Signalweg gezeigt werden, was die Vermutung zulässt, dass der Retinolsäurerezeptor RAR α ein direktes Target des Fgf Signalweges sein könnte. (Cazillis et al., 2006; Guan et al., 2001) Abbildung 4 gibt einen Überblick über die neuronale Entwicklung *in vitro* und *in vivo*.

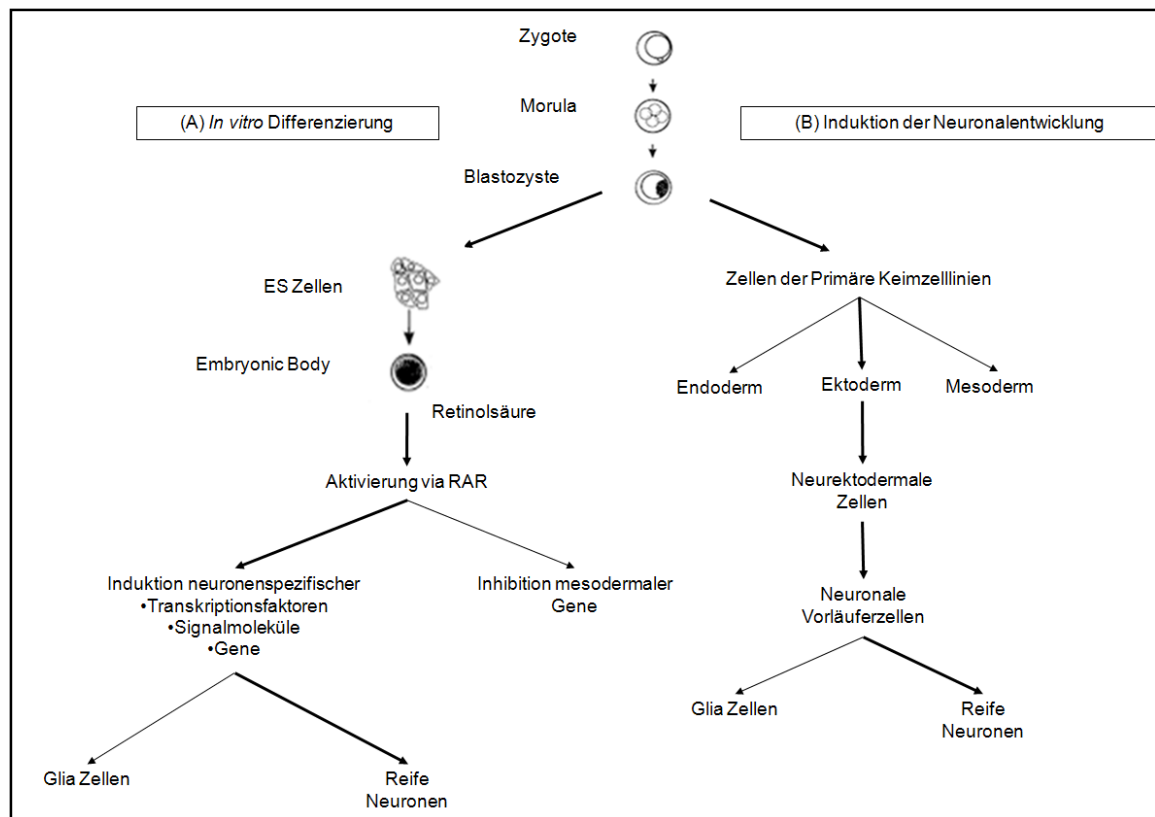


Abbildung 4:

Modell der Neuronalentwicklung in vivo und in vitro (modifiziert nach: Guan et al. 2001)

1.4.4 Einfluss von miRNAs auf die frühe Embryonal- und Neuronalentwicklung

Neben hunderten miRNAs, die in diversen Zelllinien und Organen detektiert wurden, gibt es auch einige, die spezifisch in ES Zellen exprimiert werden und während der frühen Embryonalentwicklung herunter reguliert werden. In Tabelle 2 sind einige dieser miRNAs zusammengefasst. Aus ihren unterschiedlichen Expressionsprofilen lässt sich eine mögliche Beteiligung an Prozessen der Selbsterneuerung von ES Zellen, dem Pluripotenzerhalt und der Differenzierung von ES Zellen vermuten. *In Vivo* konnte durch Knockout bzw. Knockdown von Dicer gezeigt werden, dass die miRNA Biosynthese beim Fehlen von Dicer unterbrochen wird, und dass dies zum Anhalten der Embryogenese und schließlich zur Letalität des Embryos führt. Eine ähnliche Studie in Dicer-null ES Zellen konnte zeigen, dass, obwohl in Dicer-null ES Zellen keine reifen miRNAs gebildet werden können, diese Zellen zwar lebensfähig sind und sich morphologisch nicht vom ihrem Wildtyp unterscheiden, jedoch nur eine geringe Fähigkeit zur Differenzierung zu EBs vorhanden ist. (Kanellopoulou et al., 2005) Beim Knockout von *Dcgr8*, das im Ge-

gensatz von Dicer nur an der miRNA Biosynthesen, nicht aber an der siRNA Biosynthese beteiligt ist, konnten ähnliche Phänomene beobachtet werden. Im Ergebnis zeigen diese Studien, dass der miRNA Signalweg für die Differenzierung von ES Zellen von entscheidender Bedeutung ist. (Wang et al., 2007; Blakai und Lin, 2008). Ein Knockout der miRNA miR-290 bis miR-295 *in vivo* war für die meisten homozygoten Mutanten schon im Embryonalstadium letal, nur wenige erreichten das Erwachsenenalter. (Ambros und Chen, 2007)

Neben dem Einfluss auf den Pluripotenzerhalt wurden in einer weiteren Studie zwei miRNAs untersucht, die in die Regulation der neuronalen Differenzierung einzugreifen scheinen. Bei diesen miRNAs handelt es sich um miR-9 und miR-124a. Ihre Überexpression in neuronalen Vorläufern führte zu einer 47 - 55% Reduktion der Astrozytenentwicklung. (Krichevsky et al., 2006) Aus allen diesen Studien lässt sich schließen, dass miRNA Moleküle tatsächlich sowohl an der Regulation von ES Zellen, als auch an neuronalen Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Welche Zielstrukturen diese miRNAs während der Embryonal- bzw. Neuronalentwicklung tatsächlich steuern, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Für miR-9 und miR-124a wird ein Einfluss auf den Stat3 Signalweg vermutet. (Krichevsky et al., 2006) Jüngere Untersuchungen konnte aber auch eine Verbindung zwischen dem Tgf β - Signalweg und der miRNA Biosynthese herstellen. (David et al., 2008)

Gehirnspezifische / im Gehirn angereicherte miRNA	
Gehirnspezifisch	miR-9, -9*, -124, -128
im Gehirn angereicherte	miR-125
“Könnten” Gehirnspezifische / im Gehirn angereicherte sein	miR-7, -34, -127, -129*, -132, -135, -136, -138, -139, -149, -153, -154, -218, -219, -222, -323, -326, -329, -344
miRNA mit dynamischer Expression während der Gehirnentwicklung	
Initial geringe Spiegel, gleichmäßiger Anstieg während der Embryonalentwicklung, Abfall nach der Geburt	miR-9, -9*, -125b, -181a
Initial geringe Spiegel, gleichmäßiger Anstieg während der Embryonalentwicklung, Plateau um den Geburtstermin	miR-124a, -130b
Initial geringe Spiegel, Anstieg während der Embryonalentwicklung bis ins Erwachsenenstadium	miR-103, -128
Höchste Expression in der Ratte am Tag 5 der Embryonalentwicklung (E12), dann Abfall (E12 war der früheste Zeitpunkt in der Untersuchung)	miR-17, -18, -19, -20, -92, -199a
Expression startet 14 Tage nach der Geburt (Maus)	miR-29
miRNA untersucht in Kulturen primärer Neuronen	
Expression steigt von Tag 1.5 bis Tag 14	mir-128, -191, -323, -324-5p, -326, -329, -344
Expression bleibt konstant	miR-103, -124a, -335, -129*, -151
miRNA, die durch Retinolsäure Behandlung in P19 Zellen induziert wird	
Gehirnspezifische / im Gehirn angereicherte	miR-9, -9*, -124, -125, -135, -218, -219
Nicht im Gehirn angereicherte	let-7, miR-23, -26, -30, -91, -98, -100, -103, -156
miRNA, die in primären Kulturen selber Abstammungslinie exprimiert wird	
ausschließlich in Neuronen	miR-124, -128
vornehmlich in Neuronen, aber auch in Astrozyten	miR-125
hauptsächlich in Astrozyten	miR-23

Tabelle 2:

Zusammenfassung des Expressionsprofils neuronal exprimierter miRNAs (nach: Cao et al. 2006)

2. Motivation und Ziel der Arbeit

Embryonale Stammzellen und ihre Differenzierung zu spezifischen Zelltypen und Geweben wurden in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Wegen ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihrer Pluripotenz werden sie, als Modelle für die Untersuchung grundlegender Mechanismen der frühen Embryonalentwicklung und der Entwicklung unterschiedlicher Zelltypen und Geweben, genutzt. Ein detailliertes Verständnis der molekularen Vorgänge, die entscheiden, ob eine Zelle im undifferenzierten Zustand bleibt oder einem bestimmten Differenzierungsmuster folgt, wird in Zukunft die Möglichkeit eröffnen gezielt in die Differenzierung von Zellen, Geweben und Organismen einzugreifen. Mögliche therapeutische Anwendungen sind mannigfaltig und reichen von der Stammzelltherapie bis zum gezielten Tissue Engineering.

Ein besonderes Interesse liegt in der Erforschung der Vorgänge, die der neuronalen Entwicklung zu Grunde liegen. Über die molekulare Steuerung vieler neuronale Vorgänge und die Entstehung neuronaler Erkrankungen ist nur wenig bekannt, so dass man sich aus der Erforschung der neuronalen Differenzierung und Entwicklung neue Erkenntnisse erhofft.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind ncRNA Moleküle wichtige Regulatoren zellulärer Funktionen. So sind sie beispielsweise an der Modifikation anderer RNA Moleküle, an der Regulation der Genexpression und anderen regulatorischen und infrastrukturellen Prozessen in der Zelle beteiligt. Außerdem werden sie mit der Entstehung von Krankheiten, wie z. B. Tumorerkrankungen und bestimmten neuronalen Erkrankungen, in Zusammenhang gebracht. Angesichts der komplexen Natur der embryonalen und neuronalen Entwicklung wächst zunehmend die Erkenntnis, dass nicht-kodierende RNA eine bedeutende und bislang noch nicht aufgeklärte Rolle in der Kontrolle der zugrunde liegenden zellulären Differenzierungsprozesse spielen könnte. Bislang gibt es in der Literatur jedoch nur für einige miRNAs Belege für ihre Beteiligung an diesen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen.

Um einen tieferes Verständnis der Funktionen ncRNA in der frühen embryonalen und neuronalen Entwicklung zu erhalten, ist es von großer Bedeutung möglichst viele ncRNA Moleküle, die an diesen Prozessen beteiligt sind, zu identifizieren. Eine Reihe von Studien hat sich bereits mit der Identifizierung und dem Expressionsmuster von verschiede-

nen ncRNAs im Verlauf der Differenzierung von ES Zellen zu Neuronen beschäftigt. Hierbei standen vor allem miRNA und gehirnspezifische snoRNA im Vordergrund. Da angenommen wird, dass zusätzlich andere ncRNA Spezies an Prozessen, wie z. B. der zellulären Differenzierung, der Proliferation oder der Aufrechterhaltung der Pluripotenz beteiligt sein könnten, ist es Ziel dieser Arbeit neue kleine ncRNA Kandidaten aus murinen ES Zellen und EBs zu isolieren, zu identifizieren und zu charakterisieren. Ein besonderer Fokus soll dabei auf ncRNA Moleküle gerichtet werden, die in einem Größenbereich zwischen 30 und 70 nt liegen, da dieser Bereich bislang nur wenig untersucht ist. Durch Fraktionierung der RNA sollen ncRNA Moleküle angereichert werden, die bei der Analyse aus Gesamt- RNA nicht identifiziert werden können. Da angenommen wird, dass bestimmte ncRNAs ihre Funktion auf nuklearer Ebene entfalten und deshalb in nuklearen Extrakten besser identifiziert werden können, ist es Ziel dieser Arbeit nukleare RNA Extrakte zu untersuchen und neue ncRNA Kandidaten hieraus zu isolieren und zu charakterisieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

3.1.1.1 Bakterien

Bezeichnung	Organismus	Beschreibung	Herkunft
TOP 10	<i>E.coli</i>	elektrokompetente Zellen	Laborbestand

3.1.1.2 Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Beschreibung	Herkunft
AtT-20	<i>M. musculus</i>	Hypophysentumor	Laborbestand
NIH3T3	<i>M. musculus</i>	embryonale Fibroblasten	Laborbestand
Hela	<i>H. sapiens</i>	Cervixkarzinom Zellen	Laborbestand
MEF	<i>M. musculus</i>	embryonale Fibroblasten	AG Tucker, Universität Heidelberg
G30	<i>M. musculus</i>	Embryonale Stammzellen	AG Tucker, Universität Heidelberg

3.1.2 Plasmide

Die Plasmide der EB-Bibliothek sind nach der jeweiligen Teilbibliothek (1 - 4) und dem jeweiligen Klon benannt. Die Plasmide der ersten ES-Bibliothek sind mit T gekennzeichnet; die Nummerierung setzt sich aus der jeweiligen Teilbibliothek (1 entspricht der Teilbibliothek M, 2 der Teilbibliothek L) und dem jeweiligen Klon zusammen. Die Plasmide der zweiten ES-Bibliothek sind nach der jeweiligen Teilbibliothek (1 entspricht der Teilbibliothek S, 2 der Teilbibliothek M, 3 der Teilbibliothek L) und dem jeweiligen Klon benannt

Bezeichnung	Beschreibung
pCR 2.1	Klonierungsvektor aus dem TA Cloning Kit
Plasmide der ES-Bibliotheken	pCR 2.1 plus Insert
2-8, 2-60	Z37snoRNA
T1-7, T1-17, T1-20	U3B snRNA
T1-32	U3A snRNA
T1-6, T1-8, T2-6	synthetisches Konstrukt
2-6	neuer ncRNA Kandidat, Sequenz unbekannten Ursprungs
2-7	neuer ncRNA Kandidat, Sequenz unbekannten Ursprungs
T1-21	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 5, Intron Sh2b2
T1-27	neuer ncRNA Kandidat, Chr.2, Intron Aqr
T1-9	MBII-297/U52
T2-17	Gas5 ncRNA/homolog U44 snoRNA
3-62	Asp-tRNA
T1-1, T1-5, T2-3,T2-5, T2-24, 3-4, 3-15, 3-31, 3-61, 3-64	5S rRNA
1-9, T1-10, T1-2	28S rRNA
Plasmide EB-Bibliothek	pCR 2.1 plus Insert
1-2	mmu-miR-690, pre-miRNA
1-5	neuer ncRNA Kandidat, intergenisch, homolog hsa Chr.8
2-1	mmu-miR-690, pre-miRNA
2-23	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 11, Intron AK018772
2-47	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 7, Intron Nav2
2-52	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 4, Intron Ppie
2-54	neuer ncRNA Kandidat, Chr. X, Chr 8, Chr 15, Exon Siab 1B
2-57	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 8 Intron Zfhx3
3-46	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 4, Intron Tln1
4-19	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 8, Intron Cdh8

4-22	7SL RNA
4-55	neuer ncRNA Kandidat, Chr. 4, Intron EphA8
4-56	Y3 scRNA
1-3, 1-24, 1-50, 2-4, 2-55, 3-43	18S rRNA
1-13, 1-17, 1-19, 1-26, 1-40, 1-45, 1-48, 1-55, 2-2, 2-17, 2-44, 2-48, 3-8, 3-59, 4-40, 4-45, 4-48, 4-52	28S rRNA
4-3	5S rRNA
2-10, 3-13, 4-1, 4-4, 4-7, 4-13, 4-25, 4-26, 4-54, 4-58,	4.5S RNA
2-22	45s pre rRNA
1-46, 1-58, 2-40, 3-26	synthetisches Konstrukt
2-18	Asp-tRNA, Gly-tRNA
2-8	U22 snoRNA
3-3, 3-19, 3-23, 3-25, 3-52, 3-58	Z37 snoRNA
2-58	MBII-55 snoRNA
3-56	MBII-96 snoRNA
3-2	U35 snoRNA
4-27	U14 snRNA

3.1.3 Oligonukleotide

Alle als Gensonden verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma OPERON Biotechnologies GmbH (Köln) oder der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg/Martinsried) synthetisiert. Jedes Oligonukleotid liegt in 100 µM Lösung vor.

3.1.3.1 PCR und RT Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'
Zfhx3_fwd.	CTCTTCGAAGAGGCCAAAAG
Zfhx3 rev.	GGTGGATCTTGTTGTTGAGC
β-Actin_fwd.	GGTCAGAAGGACTCCTATGTG
β-Actin_rev.	CTCATCGTACTCCTGCTTGCT
M13 fwd. (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 rev. (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC
RT Primer	Oligo (dT) ₁₈
RT Primer	Random-Hexamer

3.1.3.2 Primer zur Klonierung der RNA

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'
5' Adapter (PCR Primer fwd.)	GTCAGCAATCCCTAACGAG
PCR Primer rev.	AGGAGCCATCGTATGTCG
RT Anker Primer 1	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGT
RT Anker Primer 2	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGA
RT Anker Primer 3	AGGAGCCATCGTATGTCGGGGGGC

3.1.3.3 Hybridisierungssonden für Dot-Blot- und Kolonientransfer- Membranen

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'
A1	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAAGCAT-CATCCTGAC
A10	CCACATCAGTAAACAGTAATTTAGAGAAGG
T1-27	GCTTTCTCTTTCCCTCAGTTTATCTCTTAG
T1-21	CTTCACTAACTTCTCTGTCTTCCTTCTGAC
piR-1	AAAGCTATCTGAGCACCTGTGTTCATGTCA
U76sno	GCCACAATGATGACATCATATTTGCTACTCTTGACA GCTGGGGTGACGAT
U101sno	TTGCATGATGACTTGAATTGTCGGATACCCCT TCACCCCGTTCATGGGTG
U20sno	CTGGATCAGAACTTGACTATCTAGAGGAATTTTCCT
ES4 (synthet. Konstrukt)	ACTGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGA CGACAAAGCATCATCCC
ES2 (synthet. Konstrukt)	ACTGCCGCCACCATGGACTACAAGGACGATGA CGACAAAGCATCATCCTG
U39 snoRNA	CAGCTCTCCAAGGTTGGCTTCCCACGACGCAGT CGGGAGTGTGCAGCATACCCAGG
5S rRNA	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCCGA TCTCGTCTG
2-1_ maus clone	GGTTGTGAACCTAACCTTTAACGGCTGA
4.5S rRNA	AAAGGCTAGGCTCACAACCAAAAATATAAGAG TTCGGTTCCCAGC
1-19_28S rRNA	CCTTGTGTCGAGGGCTGACTTTCAATAGATCGCAGC
2-18_tRNA	GGTGAGCATAGCTGCCTTCCAAGCAGTTGACCC GGG
3-26	CACCATGGCACTACAAAGACGATCACGACAAA GCAT
3-19_Z37sno	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAAT
4-22_ZL7	GGAGCAGGTCAAACTCCCGTGCTGATCAGTAG TGG
3-24_sno	CCGAAAGATGGTGATTTGATTTTATTCATCATGTAC
1-17_28s	GGAGAAGGGTTCATGTGAACAGCAGTTGAACAT GG
1-40_28s	GGAGCAGAAGGGCAAAAGCTCGCTTGATCT TGATTT

1-45_28s	GTGAAGAGACATGAGAGGTHTAGAATAAGTGG GAGG
2-23	TCTTAGACGTTTTATTTCATTAGTTGGATTTCCTGCCC
4-19_cdh8	GATAGGTCTGGACTTTTACCATCATTAATA

3.1.3.4 Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
M13 fwd. (-21)	TGTAACACGACGGCCAGT
M13 rev. (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC

3.1.3.5 Hybridisierungssonden für Northern Blot

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
northA1	GTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCAT
north A10	CCTACGGTTATAACCCCCCTTCTC
north T1-21	TCAGAAGGAAGACAGAGAAGTTAG
north T1-27	AGGGAAAGAGAAAGCAAGCAGCCA
north 2-1	GGTTGTGAACCTAACCTTTAACGG
north 1-2	AGCCTAGCCTTTAACGGCTGAGCC
north 2-23	GGATTCCTGCCCAGCACTGCT
north 2-47	CTTAGCACTTCGGCTGGTGTTAGC
north 3-46	AGGGGTAGCTCAAAGGACATCATC
north 4-19	TGATGGTAAAAGTCCAGACCTATC
Nort 4-56	TGTAAACACCACTACTCTCGG
Nort 2-52	AAACCAGGTATGGTGGTGTAC
Nort 2-54	CCACTCTGACACTGAAGAATAGG
Nort 2-57	GATCTGAGGGCAGAAGCCA
Nort 4-55	TCAGCAGCTGGACTGAGTGA
U39 snoRNA	CAGCTCTCCAAGGTTGGCTTCCCCACGAC GCAGTCGGGAGT

3.1.4 Größenstandards

3.1.4.1 DNA Größenstandard

pUC19 DNA/*MspI*, Fermentas, St. Leon-Rot
26, 34, 67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501

Lamda/*PstI*, Fermentas, St. Leon-Rot
11501, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15

3.1.4.2 RNA Größenstandard

RiboRuler RNA Ladder, LowRange, Fermentas, St. Leon-Rot
100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000

Dekade Marker, Applied Biosystems, Foster City, USA
150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10

3.1.5 Radioaktive Nukleotide

[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP, GE Healthcare, Freiburg
[$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP, GE Healthcare, Freiburg

3.1.6 Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
Guanylyltransferase, 5 U/μl	Applied Biosystems, Foster City, USA
RiboLock™ RNase Inhibitor, 40 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
Poly(A)-Polymerase, 2 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Tobacco acid phosphatase (TAB), 10 U/μl	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
T4 RNA Ligase, 4 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase, 5 U/μl	Qiagen, Hilden
DNase I RNase frei, 10 U/μl	Roche, Mannheim
T4 Polynukleotid Kinase 10 U/μl	NEB, Frankfurt
Restriktionsenzyme:	
<i>Hind</i> III 10 U/μl, <i>Bam</i> HI 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.8 Medien und Zusätze

3.1.8.1 Zellkulturzusätze

Reagenz	Hersteller
DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)	PAA Laboratories, Cölbe
F12 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (Fetal calf serum) Standart Qualität	PAA Laboratories, Cölbe
NCS (Newborn calf serum)	Invitrogen, Karlsruhe
TrypLe™ Express	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Puffer (1x), -Mg ²⁺ , -Ca ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 100x	Invitrogen, Karlsruhe
MEM NEAA (nicht essentielle Aminosäuren),	Invitrogen, Karlsruhe
Esgro® (murine LIF)	Millipore, Schwabach
Mitomycin C, lyophil.	Serva, Heidelberg
Insulin	Sigma-Adrich, Steinheim
Natriumselenit	Sigma-Adrich, Steinheim
Progesteron	Sigma-Adrich, Steinheim
Putrescin	Sigma-Adrich, Steinheim
Retinolsäure, 98%, (HPLC)	Sigma-Adrich, Steinheim
Transferrin, human	Sigma-Adrich, Steinheim
Gelatine Typ A	Sigma-Adrich, Steinheim
Poly-L-Ornithin, 0,01%	Sigma-Adrich, Steinheim
Laminin, 0,5 mg/ml from EHS sarcoma (mouse)	Roche, Mannheim

3.1.8.2 Bakterien- und Medienzusätze

Reagenz	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz, >99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar (hochreine Qualität)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.9 Andere Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Agarose, NEEO, Ultra Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat, >98%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol 99%	Sigma- Adrich, Steinheim
Borsäure, p.a.	Applichem, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA) pH 7	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Chloroform, p.a.	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
CTP, 100 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs, 100 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS), reinst	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiotheit (DTT) p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA, >99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, 96%	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll®	Sigma- Adrich, Steinheim
Glycogen, 20 mg/ml	Roche, Mannheim

Harnstoff, Urea Sigma Ultra	Sigma- Adrich, Steinheim
HEPES, >99,5%, Pufferqualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heringsperma DNA	Sigma- Adrich, Steinheim
Isopropanol, 99,9%	Hausinterne Abfüllung
Isoamylalkohol	Grüssing, Filsum
Magnesiumchlorid Hexahydrat, BioUltra	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, BioUltra	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl), p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄), p.a.	neoLab, Heidelberg
Natrium-EDTA Dihydrat >99%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH), chemisch rein	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumcitrat, p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumacetat >99%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NP-40 Alternative, Protein Grade	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon (PVP) 40000	Merck, Darmstadt
Qiazol	Qiagen, Hilden
Roti®-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Sequenziergel Konzentrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure 37% AnalaR Normapur	VWR, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris >99%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.10 Puffer, Lösungen, Medien

Im Folgenden sind häufig verwendete Puffer und Lösungen aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um wässrige Lösungen.

3.1.10.1 Medien

Bezeichnung	Rezeptur
AtT-20 Medium Hela Medium	10% FCS DMEM ad 500 ml
NIH3T3 Medium	10% NCS DMEM ad 500 ml
MEF Medium	10% FCS Penicillin/Streptomycin (1x) MEM NEAA (1x) 0,001% β - Mercaptoethanol DMEM ad 500 ml
ES Medium	15% FCS Penicillin/Streptomycin (1x) MEM NEAA (1x) Esgro (LIF) 5×10^5 U 0,001%, β - Mercaptoethanol DMEM ad 500 ml
N2 Medium	118ml DMEM 118ml F-12 1,25ml Insulin (5 mg/ml) 6,25ml Humanes Transferrin (2 mg/ml) 0,25ml Progesteron (20 μ M) 0,25ml Putrescin (100 μ M) 1,25ml BSA (10 mg/ml) Penicillin/Streptomycin (1x) 25 μ l Natriumselenit (300 μ M)
LB-Medium	1% Trypton/Pepton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl
LB-Agar	1% Trypton/Pepton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 1% Agar-Agar

3.1.10.2 Puffer/ Lösungen

Bezeichnung	Rezeptur
TBE pH 8,3 (10x)	0,02 M EDTA 500 mM Tris 500 mM Borsäure
DNase I Puffer	1 mM MgCl ₂ 2 mM EDTA 33 mM Natriumacetat 40 mM Tris
Puffer A	10 mM HEPES 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 1 mM DTT
Tailing Puffer (10x)	0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) 2 M NaCl 100 mM MgCl ₂ 4 mM EDTA 20 mM MnCl ₂
APH	0,1% Ficoll 0,1% Polyvinylpyrrolidon 0,1% BSA 1% SDS 0,6 M NaCl 0,06 mM Natriumcitrat
Denhardt (20x)	0,4% Ficoll 0,4% Polyvinylpyrrolidon 0,4% BSA
Hybridisierungspuffer	0,178 M Na ₂ HPO ₄ 0,822 M NaH ₂ PO ₄ 7% SDS
SSC pH 7,0 (20x)	3 M NaCl 0,3 mM Natriumcitrat
Waschpuffer I	10% SSC (20x) 0,1% SDS
Waschpuffer II	1% SSC (20x) 0,1% SDS

3.1.11 Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.1.11.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bakteriologische Platten Ø 100 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße Safelock 1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Multi 1,5/2,0 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zentrifugen Röhrchen 15/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nylonmembran Hybond-N ⁺	GE Healthcare, Freiburg
Pipetten 2/10/20/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 2/10/20/200/1000/5000/10000/25000 µl	Thermo Scientific, Dreieich
Skalpell Chirurgisches Einmalskalpell	B. Braun, Melsungen
Spritzen Omnifit 10/50 ml	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,22/0,45 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen 25/75/175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Cellstar 6 Well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen Cellstar Ø 100 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.11.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose Gelelektrophorese	Biozym
Analysenwaage CPA124S	Sartorius
Brutschrank: Hera Cell 150	Kendro
Elektroblotter: Fastblot B33	Biometra
Elektroporationsgerät: Gene Pulser Xcell system	BioRad
Gefrierschrank -80°C	Thermo Electron
Gelapparatur PAGE: Mighty Small SE250	GE Healthcare

Geldokumentation: DigiPrint R3000	peqLab
Kontaminationsmonitor: LB125	Berthold
Hybridisierungssofen: Hybrid Shake 'n' Stack Hybridization Oven	Thermo Forma
Inkubator für Bakterienkulturen: BE400	Memmert
Kühlschrank +4°C/-20°C	Liebherr
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße 1,5/2 ml: 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge für Zentrifugenröhrchen: Multifuge® 1 L-R	Heraeus
Lichtmikroskop: Motic AE31	CMS
Mastercycler: Mastercycler epgradient	Eppendorf
Mikrowelle: NN E-233 MB	Panasonic
Netzgerät für Northern-Blot 3501-XL	GE Healthcare
Netzteil für Agarosegele E132	Consort
Netzteil für PAGE PS305	Apelex
pH-Meter: HI 211	Hanna Instruments
Phosphor Screen Reader: Typhoon 9400	GE Healthcare
Präzisionswaage CPA2202S	Sartorius
Storage Phosphor Screen	GE Healthcare
Thermomixer: Thermomixer comfort 1.5/2.0ml	Eppendorf
UV Crosslinker: CL-1000	UVP
UV Spektrometer: Nanodrop ND-1000	Nanodrop
Vortex Reagenzglasrührer: 7-2020	Neolab
Wasserbad 1083	GFL
Zellkulturbank: Hera Safe KS 12	Kendro
Zentrifuge für Reaktionsgefäße 1,5/2 ml: Biofuge pico	Heraeus

3.1.11.3 Software

Bezeichnung	Hersteller
Photoshop CS	Adobe
Excel, PowerPoint, Word	Microsoft
Bio-Edit	Tom Hall
ImageQuant 5.2	GE Healthcare

3.1.11.4 Sequenz-Datenbanken

Bezeichnung	Betreiber	Internet-Seite	Referenz
NCBI GenBank	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Benson et al., 2007
USCS Genom Browser	USCS	http://genome.ucsc.edu/	Karolchik et al. 2008
miRBase	Wellcome Trust Sanger Institute	http://microrna.sanger.ac.uk/	Griffiths-Jones, 2008
fRNA db	ncRNA.org	http://www.ncrna.org/frnadb	Mituyama et al. 2008

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zelllinien

AtT-20 und Hela Zellen werden in DMEM Medium, das 10% FCS enthält, unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. NIH3T3 Zellen werden in DMEM Medium, dem 10% NCS zugesetzt wird, unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

3.2.1.2 Kultivierung von ES Zellen

Vor der eigentlichen ES Zellkultur werden embryonale Fibroblasten der Maus (MEF) in MEF Medium kultiviert und nach Erreichen 100%-iger Konfluenz mit Mitomycin C (Endkonzentration: 10 µg/ml) inaktiviert. Auf den inaktivierten MEF Zellen werden die ES Zellen ausgesät und in ES Medium kultiviert. Anschließend werden die ES Zellen ohne MEF Zellen auf Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm überführt, die vor der Verwendung mit 0,2% Gelatinelösung beschichtet wurden. Die Kultivierung erfolgte bei Standardbedingungen für zwei bis drei Passagen. Alle zwei Tage werden die Kulturen passagiert.

3.2.1.3 Neuronale Differenzierung der ES Zellen

Die Differenzierung der ES Zellen beginnt mit der Bildung der Embryonic Bodies (EBs). Hierfür werden je 3×10^6 ES Zellen auf bakteriologische Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm übertragen und acht Tage in MEF Medium kultiviert. Nach 24 – 48 Stunden haben sich die ES Zellen zu EBs zusammengelagert. Alle zwei Tage wird das Medium der EB Kultur gewechselt. Am Tag vier und sechs wird dem Medium zur Induktion der neuronalen Differenzierung 5 µM Retinolsäure zugesetzt. Am achten Tag werden die EBs dissoziiert, auf mit Poly-L-Ornithin und Laminin beschichtete 24-Well Zellkulturplatten ausplattiert und anschließend 24 Stunden in N2 Medium kultiviert.

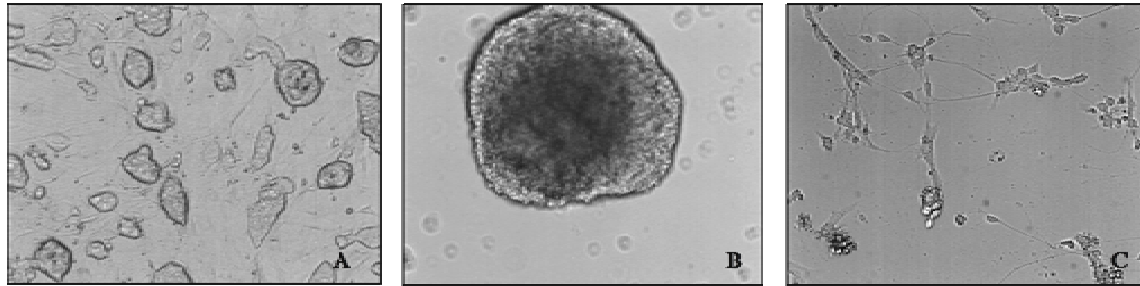


Abbildung 5:

3 Stadien der neuronalen Differenzierung

(A) ES Zellen 48h auf MEF Zellen, (B) EB 8 Tage in Kultur, (C) neuronale Vorläufer 24h nach Dissoziation der EBs

3.2.2 Fraktionierung der Zellkerne und des Zytoplasma

Zur Präparation der Zellkerne werden die entsprechenden Zellen von den Kulturschalen geerntet. Pro Ansatz werden 10^7 Zellen mit 1x PBS Puffer gewaschen und fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit dem Vierfachen des eigenen Volumens, etwa 400 μ l, eiskalten Puffers A versetzt und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ l NP-40 Alternative wird die Suspension 10 Sekunden intensiv gemischt und anschließend bei mehr als 9000 U/min 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand enthält die Zytoplasmafraktion. Das Zellpellet wird nochmals in 500 μ l eiskaltem Puffer A resuspendiert, mit 20 μ l NP-40 Alternative versetzt und anschließend wieder bei mehr als 9000 U/min 30 Sekunden zentrifugiert. Das Pellet enthält die gereinigten Zellkerne.

3.2.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.3.1 RNA Isolation

3.2.3.1.1 RNA Isolation aus dem Zellkern und der Zytoplasmafraktion

DNase I Verdau:

Die Zellkerne werden in 0,5 ml DNase I Puffer gewaschen und bei mehr als 9000 U/min in der Minizentrifuge für 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend werden sie in 0,5 ml DNase I Puffer, der 1 µl DNase I (10 U/µl) enthält, resuspendiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Je 400 µl der Zytoplasmafraktion wird mit 200 µl DNase I Puffer versetzt und nach Zugabe von 1 µl DNase I (10 U/µl) zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

RNA Isolation:

Die eigentliche RNA Isolation erfolgte nach der Trizolmethode. (Chomczynski und Sacchi, 1987). Nach dem DNase I Verdau werden die Zellkerne bzw. die Zytoplasmafraktion mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 200 µl Chloroform zugegeben und 15 Sekunden intensiv gemischt. Nach weiteren zwei bis drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Proben zehn Minuten bei 13000 U/min in der Minizentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit Isopropanol bei Raumtemperatur zehn Minuten gefällt und anschließend weitere zehn Minuten bei 13000 U/min in der Minizentrifuge zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit vorsichtig Ethanol (80%) gewaschen und nach dem Trocknen in RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.2.3.1.2 RNA Isolation Gesamt- RNA

Gesamt-RNA wird entweder mit der Trizolmethode oder mit einem RNasy Mini Kit (Qiagen) gewonnen. Die Trizolmethode wird verwendet, wenn auch RNA kleiner 200 nt isoliert werden soll, in allen anderen Fällen wird das RNasy Kit verwendet. In beiden Fällen erfolgt die Zelllyse direkt in der Zellkulturschale entweder mit Trizol, im Falle der Trizolmethode, oder mit RLT Lysepuffer, gemäß den Angaben des RNasy Mini Kits.

3.2.3.2 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

3.2.3.2.1 Isolation von Plasmid DNA aus *Escherichia coli* (*E.coli*) im kleinen Maßstab

Die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgt nach der von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) beschriebene Methode, der alkalischen Lyse. Isolierte Plasmid-DNA wird in 50 µl gelöst und bei -20°C gelagert.

3.2.3.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, die sequenziert werden soll, wird im Anschluss an die Isolation mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach dem, vom Hersteller empfohlenen, Protokoll gereinigt.

3.2.3.3 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren

3.2.3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen dient die Phenol-Chloroform-Extraktion. Die wässrige Lösung wird mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min kann die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden und durch Zugabe eines Volumens Chloroform vom verbliebenen Phenol befreit werden. Aus der wässrigen Phase wird die Nukleinsäure anschließend durch Fällung mit Ethanol (96%) abgetrennt.

3.2.3.3.2 Fällen von Nukleinsäure

Um aus wässrigen Lösungen Nukleinsäuren abzutrennen, werden diese mit Ethanol oder Isopropanol gefällt. Die Nukleinsäurelösung wird hierbei mit Natriumacetat (3 M) auf eine Konzentration von 0,3 M eingestellt und mit dem dreifachen Volumen eiskaltem Ethanol (96%) oder dem gleichen Volumen Isopropanol (99%) unter Zugabe von 1 µl Glykogen (20 mg/ml) über Nacht bei -20°C, oder für 30 min bei -80°C, gefällt. Nach

Zentrifugation bei 13000 U/min wird das entstandene Pellet mit Ethanol (70-80%) gewaschen und getrocknet.

3.2.4 RNA- und DNA-Gelelektrophorese

3.2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.2.4.1.1 Denaturierende Gele (8%, 15%) zur Auftrennung von RNA

Rotiphorese[®] Sequenziergel Konzentrat (25%, 8 M Harnstoff) wird mit Harnstofflösung (50%, w/w) und 5x TBE/Harnstoffpuffer (Harnstoff 50%, w/w in 5x TBE) auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Nach der Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10%) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) erfolgt die Polymerisation des Gels. Das Gel wird anschließend 30 Minuten bei 100 V in 1x TBE Puffer equilibriert. Vor dem Auftragen werden die Proben mit dem gleichen Volumen 2x RNA Ladepuffer (2x RNA Loading Dye, Fermentas) versehen und eine Minute bei 90°C denaturiert. Als Standard dienen pUC19/*MspI* oder Riboruler RNA Ladder Low Range. Die Auftrennung erfolgt ein bis drei Stunden im elektrischen Feld unter einer Spannung von 10 V/cm Gelstrecke. Anschließend werden die Proben im Gel mit einer geeigneten Methode detektiert.

3.2.4.1.2 Native Gele (8%, 15%) zur Auftrennung von DNA

Rotiphorese[®] Gel 30 wird mit Wasser und 5x TBE Puffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Nach der Zugabe von APS (10%) und TEMED erfolgt die Polymerisation des Gels. Das Gel wird dann 30 Minuten bei 100 V in 1x TBE Puffer equilibriert. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x DNA Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas) versehen und auf das Gel aufgetragen. Als Standard dienen die DNA Marker pUC19/*MspI* oder λ /*PstI*. Die Auftrennung erfolgt über ein bis drei Stunden im elektrischen Feld unter einer Spannung von 10 V/cm Gelstrecke. Anschließend werden die Proben im Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht bei 354 nm detektiert.

3.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese zu Auftrennung von DNA

Agarosepulver wird in 0,5x TBE-Puffer unter Erwärmen gelöst, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,1 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach 30 Minuten wird das ausgehärtete Gel in eine mit 0,5x TBE Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas) versehen und auf das Gel aufgetragen. Als Standard dienen die DNA Marker pUC19/*MspI* oder λ /*PstI*. Die Auftrennung erfolgt im elektrischen Feld unter einer Spannung von 10 V/cm. Anschließend werden die Proben im Gel im UV-Licht bei 354 nm detektiert.

3.2.5 Gelextraktion aus Polyacrylamid-Gelen

Aus Polyacrylamid-Gelen können Nukleinsäuren durch passive Diffusion zurückgewonnen werden. Hierzu werden die Gelstücke, aus denen die Nukleinsäure zurückgewonnen werden soll, zunächst mechanisch mit einem Pistill zerkleinert. Anschließend wird die Nukleinsäure über Nacht bei 4°C mit 10 ml Elutionspuffer unter Schütteln aus dem zerkleinerten Gel herausgelöst. Als Elutionspuffer dient Natriumacetatlösung (0,3 M). Am nächsten Tag werden die Gelbestandteile vom jetzt nukleinsäurehaltigen Elutionspuffer durch Zentrifugation getrennt. Die Nukleinsäure im Elutionspuffer wird in einer Konzentrationsäule (Vivaspin 15R, Millipore) aufkonzentriert. Im Anschluss wird sie durch Fällung mit Ethanol (96%) aus dem Elutionspuffer zurückgewonnen.

3.2.6 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

3.2.6.1 Markierung von RNA Molekülen (*In vitro* RNA-Capping)

Um kleine ncRNAs zu detektieren, werden RNA Proben mit einer radioaktiven m⁷G-Cap-Struktur versehen. In der Markierungsreaktion findet das Enzym Guanylyltransferase (Ambion, Frankfurt) Verwendung. Guanylyltransferase katalysiert in diesem Prozess drei Reaktionen. Zum einen besitzt sie Triphosphatase Aktivität und kann dadurch am 5' Ende ein Phosphat der Triphosphatgruppe entfernen, desweiteren kann Guanylyltransferase ein GTP an das 5' Ende des RNA Moleküls in 3'-5' Orientation transferieren und produziert

somit eine 5'-5' Bindung zwischen dem GTP Molekül und dem 5' Ende der RNA. Als Drittes kann das Enzym eine Methylgruppe von einem Donor Molekül (S-Adenosin-Methionin, SAM) auf die 7' Position des terminalen Guanosin übertragen.

Für eine Markierungsreaktion werde 1 µg RNA, 1,5 µl 10x Puffer, 2 µl [α - 32 P]GTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/µl), 1 µl SAM, 1 µl Guanylyltransferase (5 U/µl) und 1 µl Ribo-LockTM RNase Inhibitor (40 U/µl) eingesetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wird die RNA über Nacht mit Ethanol (96%) gefällt. Das Pellet wird am folgenden Tag in 15 µl RNase-freies Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 Markierung von DNA Oligonukleotiden

Für eine Markierungsreaktion werden 1-50 pmol DNA, 2 µl 10x Reaktionspuffer A, 2 µl [γ - 32 P]ATP (800 Ci/mmol, 10 mCi/µl) und 1 µl T4 Polynukleotid Kinase (10 U/µl) mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C werde 1 µl 0,5 M EDTA hinzugefügt und anschließend 10 Minuten auf 75°C erhitzt. Die Probe wird danach bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7 Erstellen einer cDNA Bibliothek aus nuklearer RNA

Um cDNA Bibliotheken aus nicht-kodierenden RNA Moleküle erstellen zu können, muss in einer Abfolge von Reaktionen die RNA mit bekannten Enden versehen, in cDNA umgeschrieben und in ein geeignetes Vektorsystem überführt werden. Die kritischen Schritte hierbei sind die Fraktionierung der RNA Extrakte, das Einfügen eines Poly(C)- Schwanzes an das 3' Ende der RNA und die Ligation eines 5' Adapters. Im Folgenden sind die einzelnen Reaktionsschritte, die zur Erstellung einer cDNA Bibliothek nötig sind, erläutert.

3.2.7.1 Probenvorbereitung, RNA-Markierung, Fraktionierung nach Größe

Zum Erstellen der cDNA Bibliothek wird ein Teil der isolierten nuklearen RNA mittels *in vitro* Capping radioaktiv markiert und auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel (8%) getrennt. (vgl. 3.2.6.1, 3.2.4.1) Nicht markierte RNA wird parallel auf dem Gel aufget-

rennt. Aus dem Gel werden im nicht markierten Teil Regionen, die dem Bandenmuster entsprechen, ausgeschnitten und die entsprechende RNA wird extrahiert. (vgl. 3.2.5)

3.2.7.2 C-Tailing der RNA

An die fraktionierte RNA wird im ersten Schritt ein Poly(C)- Schwanz an das 3' Ende der RNA Moleküle synthetisiert.

Aus dem Gel extrahierte RNA wird in 20 µl Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 15,5 µl Wasser wird die Probe eine Minute bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem Reaktionsgemisch aus 4 µl Magnesiumchlorid (25 mM), 5 µl 10x Tailing Puffer, 2,5 µl CTP (25 mM) und 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor wird die RNA fünf Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird 2 µl Poly(A)-Polymerase (1 U/µl) zugegeben und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird die Probe fünf Minuten auf 65°C erwärmt und eine Minute auf Eis abgekühlt. Nach Aufreinigung der RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wird die RNA mit Ethanol (96%) gefällt. Das Pellet wird in 7 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

3.2.7.3 Dephosphorylierung mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAB)

Am 5' Ende der RNA wird die Pyrophosphat Bindung durch das Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase hydrolysiert (TAP, Epicentre® Biotechnologies). Dies führt dazu, dass das β/γ-Pyrophosphat abgespalten wird und nur noch die α- ständige Phosphatgruppe am RNA Molekül verbleibt.

7 µl gecappte RNA wird mit 1 µl 10x TAP Puffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor und 1 µl TAP (10 U/µl) versetzt und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Probe fünf Minuten auf 65°C erwärmt. Nach Zugabe von 190 µl Wasser wird die dephosphoylierte RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend mit Ethanol (96%) gefällt. Das resultierende Pellet wird in 10,5 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

3.2.7.4 5' Adapter Ligation

An die α-ständige Phosphatgruppe am 5' Ende der RNA wird im Folgenden ein Oligonukleotidadapter ligiert.

1 µl 5' Adapter (100 pmol/µl) wird zur dephosphorylierten RNA gegeben. Nach Zugabe von 2 µl BSA, 2 µl T4 RNA Ligase (10 U/µl) erfolgt die Ligation des Adapters über Nacht bei 4°C im Eis-Wasserbad, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C. Nach Aufreinigung der RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wird die RNA mit Ethanol (96%) gefällt. Das Pellet wird in 10 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

3.2.7.5 Reverse Transkription

An die Adapterligation schließt sich das Umschreiben der RNA in cDNA mittels Reverse Transkription an.

1,5 µl RT Primer Mix (jeder RT Anker Primer 10 mM) und 10 µl polycytidylierte, adapterligierte RNA werden gemischt, fünf Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend mit 1 µl dNTPs (10 mM), 4 µl 5x RT Puffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor versetzt. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42°C im Wasserbad wird dem Reaktionsgemisch 1 µl Superscript II (200 U/µl) zugesetzt und 1,5 Stunden bei 42°C inkubiert.

3.2.7.6 Amplifikation der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

An die Reverse Transkription schließt sich Amplifikation der cDNA mittels PCR an. Zunächst wird die cDNA bei 94°C denaturiert, dann erfolgt die Hybridisierung der Primer, die zu den 5' bzw. 3' Enden der cDNA komplementär sind. (Annealing) Im Anschluss folgt die Elongation der Primer durch Taq Polymerase (5 U/µl).

PCR-Ansatz	Thermocyclerbedingungen		
3 µl cDNA	Initiale Denaturierung	94°C	2 min
5 µl 10x PCR Puffer	Denaturierung	94°C	1 min
0,5 µl PCR Primer fwd. (100 pM)	Annealing	53°C	1 min
0,5 µl PCR Primer rev. (100 pM)	Elongation	72°C	1 min
1 µl dNTP (10 mM)	Finale Elongation	72°C	10 min
1 µl Taq Polymerase			
Ad 50 µl H ₂ O	Denaturierung, Annealing und Elongation wird 20fach wiederholt.		

Die PCR Produkte werden auf einem 8% nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aus dem Gel wird die amplifizierte DNA im richtigen Größenbereich extrahiert und in 20 µl Wasser aufgenommen.

3.2.7.7 Ligation in pCR[®]2.1 Vektor

Hierzu wird das TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Es werden 6 µl der cDNA mit 1 µl 10x Puffer, 2 µl pCR[®]2.1 Vektor und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend wird die Probe mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in 50 µl Reinstwasser gelöst.

3.2.7.8 Elektrotransformation in *E.coli* Zellen

Für die Transformation werden je 100µl TOP10 elektrokompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl gereinigtem Plasmid sowie 10 µl Wasser vorsichtig gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellen werden anschließend im Gene Pulser (BioRad) bei 200 Ohm, 25 µFD und 2,5 V geschockt, wobei die Aufnahme des Plasmides erfolgt. Anschließend werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (300 U/min) kultiviert. Die Bakterienzellsuspension wird auf selektive Agar-Platten (LB-Agar mit Ampicillin (8 µg/ml)), IPTG (17.85 µg/ml) und X-Gal (50 µg/ml)) aufgebracht. Transformierte Klone erscheinen auf

den Agar-Platten, als weiße oder blaue Kolonien. Nur weiße Kolonien tragen Plasmide, die Sequenzen der cDNA-Bibliothek enthalten.

3.2.8 Analyse und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek

3.2.8.1 Überprüfungen der Klonierung

Transformierte Klone werden daraufhin überprüft, ob sie tatsächlich Plasmide mit cDNA-Inserts tragen. Hierfür werden die Kolonien entweder direkt mit PCR untersucht (Kolonien-PCR) oder es werden isolierte Plasmide mit passenden Restriktionsenzymen verdaut, um so die Länge des Inserts zu überprüfen.

3.2.8.1.1 Restriktionsverdau

In einem 10 µl Ansatz werden 5 µl (0,5-2,5 µg) isolierte Plasmid DNA in 1x Tango Puffer (Fermentas) mit *Bam*HI (0,6 U) und *Xba*I (0,45 U) über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend werden 5 µl des Ansatzes auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und die Länge der cDNA-Inserts überprüft.

3.2.8.1.2 Kolonien-PCR

Bei der Kolonien-PCR wird das Insert im Plasmid direkt aus intakten Zellen amplifiziert. Hierbei wird dem normalen PCR-Reaktionspuffer zusätzlich 1% Tween 20 als Detergenz zugesetzt, das die Lyse der Zellen bewirkt, so dass das zu analysierende Plasmid während der PCR Reaktion freiliegt.

PCR-Ansatz:	Thermocyclerbedingungen:		
<i>E. coli</i> Kolonie	1. Zyklus		
5 µl 10x PCR Puffer	Denaturierung	94°C	4 min
10 µl PCR Q-Lösung	Annealing	50°C	2 min
0,5 µl M13 Primer fwd. (100 pM)	Elongation	72°C	2 min
0,5 µl M13 Primer rev. (100 pM)	2. Zyklus		
0,5 µl Tween 20 (10%)	Denaturierung	94°C	1 min
1 µl dNTP (10 mM)	Annealing	56°C	2 min
1 µl Taq Polymerase	Elongation	72°C	1 min
Ad 50 µl H ₂ O	Finale Elongation	72°C	5 min
	Der erste Zyklus wurde einfach, der zweite Zyklus 35fach wiederholt		

3.2.8.2 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen der Plasmide wurden die Firma JenaGen GMBH (Jena) und 4base lab (Reutlingen) durchgeführt. Für jede Sequenzierung werden jeweils 10 µl aufgereinigte Plasmid (0,2 µg/ml) eingesetzt. Das Editieren der Sequenzen erfolgt manuell unter Verwendung des Sequenzalignment Editor Programms BioEdit. Die ermittelten Sequenzen werden mit online verfügbaren Gen- /Genomdatenbanken, wie NCBI Blastn und der USCS Genome Datenbank verglichen.

3.2.8.3 Analyse der cDNA-Bibliothek durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Um nicht alle Klone der cDNA-Bibliothek durch Sequenzieren analysieren zu müssen, werden alle Klone auf Nylonmembranen übertragen. Die Übertragung auf die Membranen erfolgt durch Kolonien-Transfer oder Dot-Blot-Technik. Bereits bekannte oder mehrfach vorkommende Sequenzen werden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden von neuen Sequenzen unterschieden.

3.2.8.3.1 Kolonien-Transfer

Von den selektiven Agar-Platten werden die Kolonien, die die Plasmide mit Sequenzen der cDNA-Bibliothek tragen in regelmäßiger Anordnung auf neue selektive LB-Agar-Platten überimpft. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C werden die angewachsenen Kolonien durch Auflegen einer Nylonmembran (Hybond N⁺, GE Healthcare) auf diese übertragen. Die Membran wird anschließend mit den Kolonien nach oben auf ein Filterpapier gelegt und nacheinander mit verschiedenen Lösungen für jeweils 10 Minuten behandelt, so dass die Zellen durch alkalische Lyse aufgebrochen werden und die Plasmid-DNA auf der Membran fixiert wird. Aufeinander folgen SDS-Lösung (10%), eine Lösung aus Natriumhydroxid (0,5 M) und Natriumchlorid (1,5 M), eine Lösung aus Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0) und Natriumchlorid (1,5 M) und 2x SSC Puffer. Zwischen jedem Inkubationsschritt wird die Membran kurz getrocknet, um überschüssige Reste der jeweiligen Lösung zu entfernen. Am Ende werden die auf der Membran anhaftende Plasmid-DNA mittels UV-Crosslinker bei 120 mJ/cm² mit der Membran vernetzt.

3.2.8.3.2 Dot-Blot-Technik

Bei der Dot-Blot-Technik wird bereits isolierte Plasmid-DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und fixiert. Hierzu wird die Membran (Hybond N⁺) 10 Minuten mit deionisiertem Wasser befeuchtet. Zur Plasmid-DNA werden Natriumhydroxid-Lösung (1 M, Endkonzentration: 0,4 M) und EDTA-Lösung (100 mM, Endkonzentration: 10 mM) gegeben. Anschließend wird die Mischung bei 100°C 10 Minuten erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation werden in zwei Schritten insgesamt je 4 µl des Gemisches auf die Membran aufgebracht. Nach Trocknung wird die Membran mit 2x SSC Puf-

fer gewaschen. Am Ende wird die auf der Membran anhaftende Plasmid-DNA mittels UV-Crosslinker bei 120 mJ/cm² mit der Membran vernetzt.

3.2.8.3.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

In einem Hybridisierungsröhrchen wird die im Kolonie-Transfer bzw. mit der Dot-Blot-Technik vorbereitete Membran mit 6x SSC Puffer gewaschen und anschließend mit 20 ml vorgewärmter APH Lösung versetzt. 15 Minuten wird die Membran bei 68°C im Hybridisierungssofen equilibriert. Parallel werden die vorher radioaktiv markierten DNA-Sonden 10 Minute auf 100°C erhitzt und danach sofort eine Minute auf Eis abgekühlt. In 20 ml vorgewärmter APH Lösung (68°C) werden jeweils 10 µl DNA Sonde gegeben. Die APH Lösung aus dem Hybridisierungsröhrchen wird durch die APH Lösung, ersetzt, die die DNA-Sonden enthält und über Nacht bei 68°C unter Rotation hybridisiert. Am nächsten Tag wird die Membran nacheinander zweimal jeweils 10 Minuten gewaschen, um ungebundene DNA-Sonden und freie Radioaktivität zu entfernen. Im ersten Waschschrift wird Waschpuffer I, im zweiten Waschpuffer II verwendet. Anschließend wird die Membran mit 2x SSC Lösung gespült und in Kunststoffolie eingepackt. Mit der Membran wurde eine Storage Phosphor Platte 2 Stunden belichtet und diese auf einem Phosphor Imaging Reader (Typhoon 9440) ausgelesen.

3.2.9 Northern-Blot

Der Northern-Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Übertragung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine Membran. Die auf der Membran fixierten RNA Moleküle können mittels komplementärer DNA-Sonden detektiert werden.

Für die Detektion neuer RNA Kandidaten auf dem Northern-Blot wird zwischen 20 und 50 µg RNA auf einem 8% denaturierendem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Aus in Filterpapier (Whatman, 3mm), das mit 0,5x TBE Puffer getränkt ist, einer Nylonmembran (Hybond N⁺) und dem Gel wird ein Sandwich aufgebaut und in eine Elektroblot-Apparatur für halbtrockenes Blotten (Fastblot B33) gelegt. Durch Anlegen von Spannung (200 mA, 30 Minuten) wird die RNA aus dem Gel auf die Membran übertragen. Anschließend wird die Membran aus der Blotting-Kammer entnommen und vier Minuten bei 120 mJ/cm² in einem UV-Crosslinker vernetzt.

In einem Hybridisierungsröhrchen wird diese Membran mit 30 ml Hybridisierungslösung versetzt. Während die Membran 60 Minuten im Hybridisierungsofen bei 58°C vorhybridisiert, wird die vorher radioaktiv markierten DNA-Sonden 10 Minute auf 100°C erhitzt und danach sofort eine Minute auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl DNA-Sonde zur Hybridisierungslösung wird die Membran über Nacht bei 58°C unter Rotation hybridisiert. Am nächsten Tag wird die Membran nacheinander zweimal jeweils 10 Minuten gewaschen, um ungebundene radioaktiv markierte Sonden zu entfernen. Im ersten Waschschrift wird Waschpuffer I, im zweiten Waschpuffer II verwendet. Nach kurzem Spülen der Membran mit Wasser wird diese in Kunststoffolie eingepackt. Mit der Membran wird eine Storage Phosphor Platte 2 Stunden belichtet und diese auf einem Phosphor Imaging Reader (Typhoon 9440) ausgelesen.

4. Ergebnisse

4.1 Qualitative Untersuchung der Verteilung nicht-kodierender RNAs aus der Zellkern von ES Zellen und EBs

Es ist bekannt, dass im Verlauf der zellulären Differenzierung die Expression verschiedener ncRNA verändert wird (Mattick und Makunin, 2006; Cao et al. 2006) und dass diese geregelte Expression bestimmter ncRNAs einen Einfluss auf den Verlauf der Differenzierung haben kann (Krichevsky et al., 2006). Um zu zeigen, dass sich auch nukleare Extrakte aus murinen ES Zellen und EBs in der Zusammensetzung ihrer ncRNA Fraktionen unterscheiden, wurde aus murinen ES Zellen und EBs nukleare RNA präpariert und untersucht. Hierfür wurden, wie unter Material und Methoden in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ES Zellen kultiviert. Aus diesen ES Zellen wurden sphäroplastische EBs erzeugt, die durch Behandlung mit Retinolsäure zur Differenzierung in eine neuronale Richtung stimuliert wurden. Zur RNA Isolation wurden undifferenzierte ES Zellen und EBs am achten Tag nach Bildung der Sphäroblasten verwendet.

Um Unterschiede in den beiden Differenzierungsstadien zu detektieren, wurden die RNA Isolate zuerst auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. RNA Isolate aus beiden Differenzierungsstadien wiesen hier keine fundamentalen Unterschiede auf. (Abb.5) Erwartungsgemäß konnten häufig vorkommende ncRNA Moleküle, wie 5,8S rRNA bei 160nt, 5S rRNA bei 120nt und die tRNA Fraktion zwischen 70 und 90 nt, detektiert werden. Kleine (<100nt) oder selten vorkommende ncRNAs lassen sich auf diese Weise jedoch nicht nachweisen, da ihr Signal auf den mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen unterhalb der detektierbaren Nachweisgrenze liegt.

Um auch selten vorkommende bzw. kleine ncRNAs nachweisen zu können, wurde die RNA radioaktiv markiert. Da nicht-kodierende RNA Moleküle, wie bereits in der Einleitung beschrieben, durch verschiedene Biosynthesewege gebildet werden können und somit unterschiedlich gestaltete 5' und 3' Enden besitzen, wurde mit dem *in vitro* Capping (vgl. Material und Methoden 3.2.6) eine Methode zur Markierung der RNA gewählt, die ausschließlich triphosphorylierte RNA detektieren kann. Durch das Übertragen einer künstlichen, radioaktiven m⁷G-Cap-Struktur (*in vitro* Capping) an das 5' Ende dieser RNA werden aus den nuklearen RNA Isolaten nur die ncRNA Moleküle nachgewiesen, die keine

natürliche Cap-Struktur besitzen und al *de novo* synthetisierte Produkte eine 5' Triphosphatgruppe tragen.

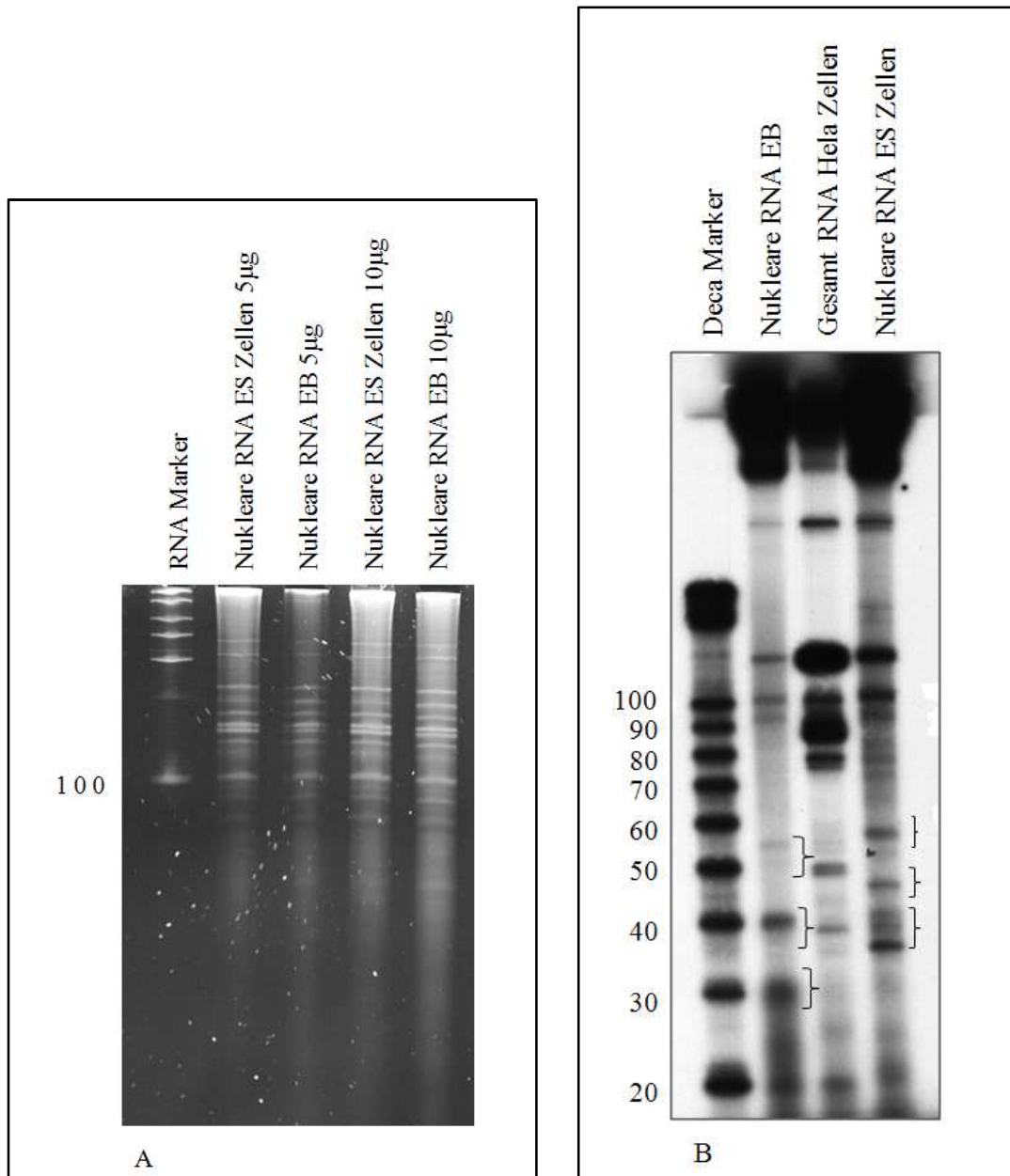


Abbildung 6:

Qualitative Untersuchung nuklearer RNA Extrakte

(A) 8% denat. Polyacrylamidgel mit nukleare RNA Extrakten aus ES Zellen und EBs, Ethidiumbromidfärbung

(B) In vitro Capping Experiment: 8% denat. Polyacrylamidgel mit nukleare RNA Extrakten aus ES Zellen und EBs und Gesamt-RNA aus Hela Zellen, die Klammern veranschaulichen die Unterschiede in den Extrakten

Nukleare RNA aus murinen ES Zellen und EBs (Tag 8) wurden mittels *in vitro* Capping mit einer radioaktiven m⁷G-Cap-Struktur versehen. Nach dem Auftrennen auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel, lassen sich in beiden Differenzierungsstadien deutliche Unterschiede in der Verteilung kleiner ncRNA, ohne natürliche Cap-Struktur, ausmachen. In der aus EBs isolierten RNA Probe können drei Banden im Größenbereich unter 100 nt unterschieden werden. Eine Bande liegt bei 30 nt und eine bei 40 nt. Im Bereich zwischen 50 nt und 60 nt ist eine weitere, etwas schwächere Bande auszumachen. Auch im Isolat aus den ES Zellen sind drei charakteristische Bereiche zu erkennen. Zum einen ein Bereich zwischen 35 nt und 45 nt, der je nach Auflösung des Gels als eine oder drei Banden erscheint (Abb. 6 und 7), desweiteren eine Bande bei etwa 48 nt und eine Bande bei etwa 58 nt.

Um das Vorkommen kleiner ncRNA in ES Zellen und EBs mit dem einer Zelllinie zu vergleichen, deren Genese von neuronalen Differenzierungsmustern unabhängig ist, wurde aus Hela-Zellen Gesamt-RNA isoliert und eine künstliche m⁷G-Cap-Struktur eingeführt. Das *in vitro* Capping Muster der Hela-Zell RNA unterscheidet sich sowohl von dem der ES Zellen, als auch von dem der EBs.

Aus der unterschiedlichen Größenverteilung der mit der m⁷G-Cap-Struktur versehenen RNA in den drei Zellpopulationen lässt sich erkennen, dass in unterschiedlichen Zelllinien verschiedene nicht ncRNA Moleküle ohne Cap-Struktur vorkommen. Durch das unterschiedliche Capping-Muster in ES Zellen und EBs ist außerdem zu erkennen, dass sich während der Differenzierung von ES Zellen zu Neuronen schon am achten Tag der Differenzierung der EBs, die Expression ncRNA grundlegend verändert haben muss.

4.2 Identifizierung neuer ncRNA Kandidaten aus ES Zellen und EBs

Da sich das Expressionsmuster der RNA Spezies, die keine Cap-Struktur besitzen, in den beiden Differenzierungszuständen stark unterscheidet, stellt sich die Frage, um welche RNA Moleküle es sich, bei den Banden im *in vitro* Capping Experiment, im Einzelnen handelt. Um die Identität dieser RNA Moleküle aufzuklären, wurde aus den einzelnen Banden cDNA Bibliotheken erstellt. Hierzu wurde erneut ein Aliquot nuklearer RNA *in*

vitro mit einer radioaktiven m^7G -Cap-Struktur versehen und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. (Abb. 7) Parallel wurden 30 μg nuklearer RNA, ohne radioaktive Markierung, auf demselben Gel aufgetrennt. Aus dem Teil des Gels, auf dem die nicht radioaktiv markierte RNA aufgetrennt wurde, wurden die Bereiche ausgeschnitten, denen Banden in der markierten Probe zugeordnet werden konnten. Wie unter Material und Methoden in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, wurde aus den fraktionierten RNA Proben, cDNA Bibliotheken erstellt. Hierzu wurde die RNA mit bekannten Enden versehen, mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und nach anschließender Amplifikation in das pCR2.1 TA Vektorsystem (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. In Abbildung 8 und 9 sind exemplarisch die Ergebnisse nach der Amplifikation der cDNA dargestellt. Die Verteilung und Länge der PCR Banden entspricht dem, was nach der Größenfraktionierung der RNA zu erwarten ist.

Auf diese Weise entstanden aus EB RNA vier cDNA Bibliotheken (EB 1 - EB 4), die den Banden des *in vitro* Capping Experiments entsprechen (Abb. 7A). Aus ES RNA wurden insgesamt zweimal cDNA Bibliotheken hergestellt. Sie entstanden im Rahmen der Masterarbeit von Michael Hofer. (Hofer, 2006). Die erste Bibliothek enthält aber nur relativ wenige Klone und beinhaltet nur zwei Fraktionen, die die den Banden M und L entsprechen. Die zweite cDNA Bibliothek der ES RNA wurden aus drei Fraktionen gebildet, die den Banden S, M und L im *in vitro* Capping Experiment entsprechen. (Abb. 7B)

Die einzelnen Bibliotheken wurden anschließend analysiert, um neue ncRNA Kandidaten zu ermitteln.

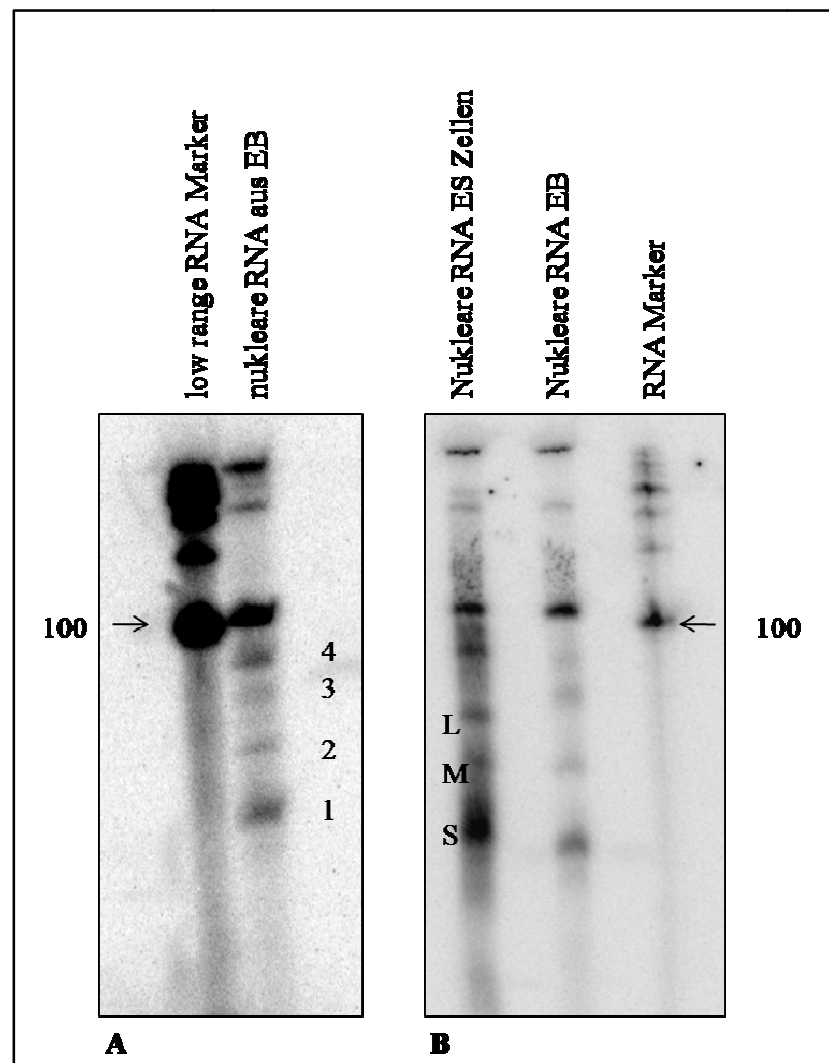


Abbildung 7:

In vitro Capping Experimente zur Fraktionierung und Herstellung der cDNA Bibliotheken aus ES Zellen und EBs

(A) nuklearer RNA Extrakt aus EBs auf einem 8%-igen denat. Polyacrylamidgel aufgetrennt, 1 bis 4 bezeichnet jeweils die Bande, die der entsprechenden Teilbibliothek zugeordnet sind

(B) nukleare RNA Extrakte aus ES Zellen und EBs auf einem 8%-igen denat. Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit S, M und L sind die Bande bezeichnet, die der jeweiligen ES Teilbibliothek entsprechen

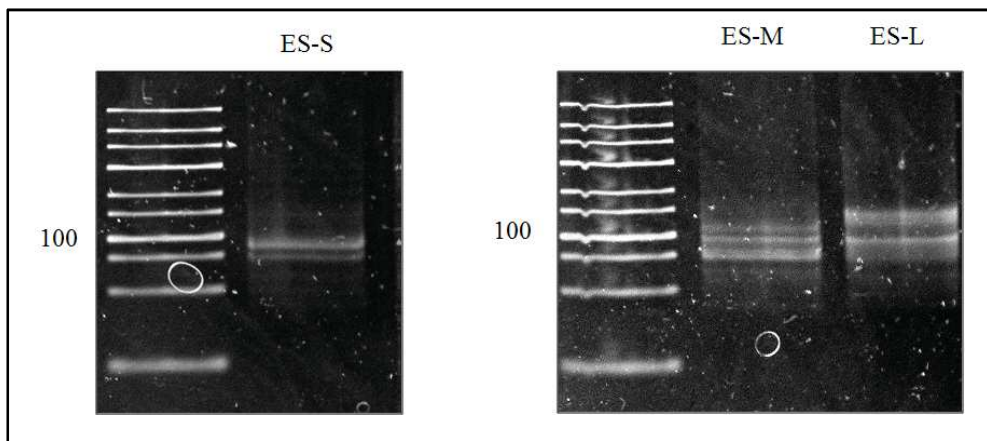


Abbildung 8:

ES cDNA auf nativem Polyacrylamidgel nach der PCR im Rahmen der Herstellung der cDNA Bibliothek Für alle 3 Bibliotheken (S, M, L) sind jeweils spezifische Banden entsprechend der Größe der zu Grunde liegenden RNA zu sehen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die cDNA aufgrund des Herstellungsprotokolls um ca. 40nt länger ist, als das ursprüngliche RNA Äquivalent

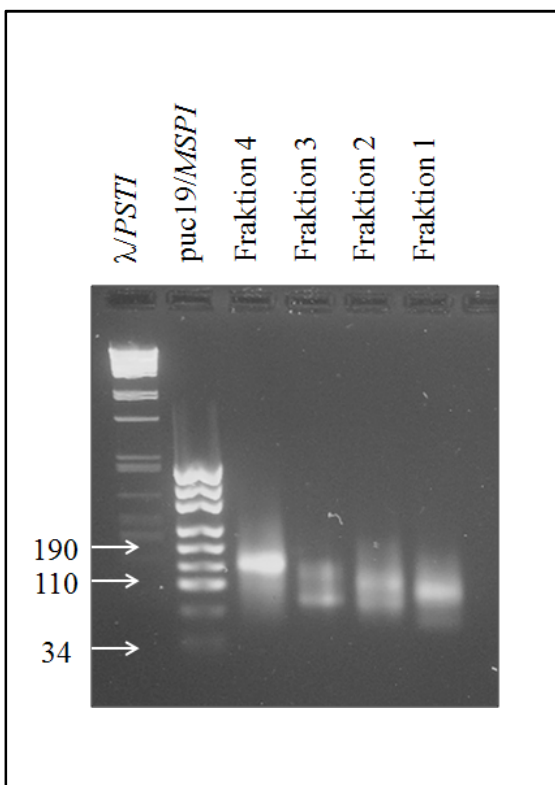


Abbildung 9:

EB cDNA auf 1,5% Agarosegel nach der PCR im Rahmen der Herstellung der cDNA Bibliothek Für alle 4 Bibliotheken (1 bis 4) sind jeweils spezifische Banden entsprechend der Größe der zu Grunde liegenden RNA zu sehen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die cDNA aufgrund des Herstellungsprotokolls um ca. 40nt als länger ist, das ursprüngliche RNA Äquivalent

4.3 Analyse der EB Bibliotheken

Zusammen bestehen alle EB Bibliotheken aus 2154 cDNA Sequenzen, wobei die Teilbibliothek EB 1 aus 564, EB 2 aus 458, EB 3 aus 559 und EB 4 aus 573 Sequenzen besteht. Aus jeder Bibliothek wurden einigen transformierte Kolonien zufällig ausgewählt, aus denen Plasmid isoliert wurde. Mittels Restriktionsverdau (vgl. 3.2.8.1) wurde überprüft, ob die Plasmide tatsächlich ein Insert tragen. Abbildung 10 zeigt beispielhaft einige verdauten Plasmide nach der Auftrennung auf einem Agarosegel. Die Größe der Inserts unterscheidet sich sowohl zwischen den einzelnen Plasmiden, als auch zwischen den cDNA Teilbibliotheken, wobei eine Zunahme der Länge von Fraktion 1 bis Fraktion 4 beobachtet werden kann.

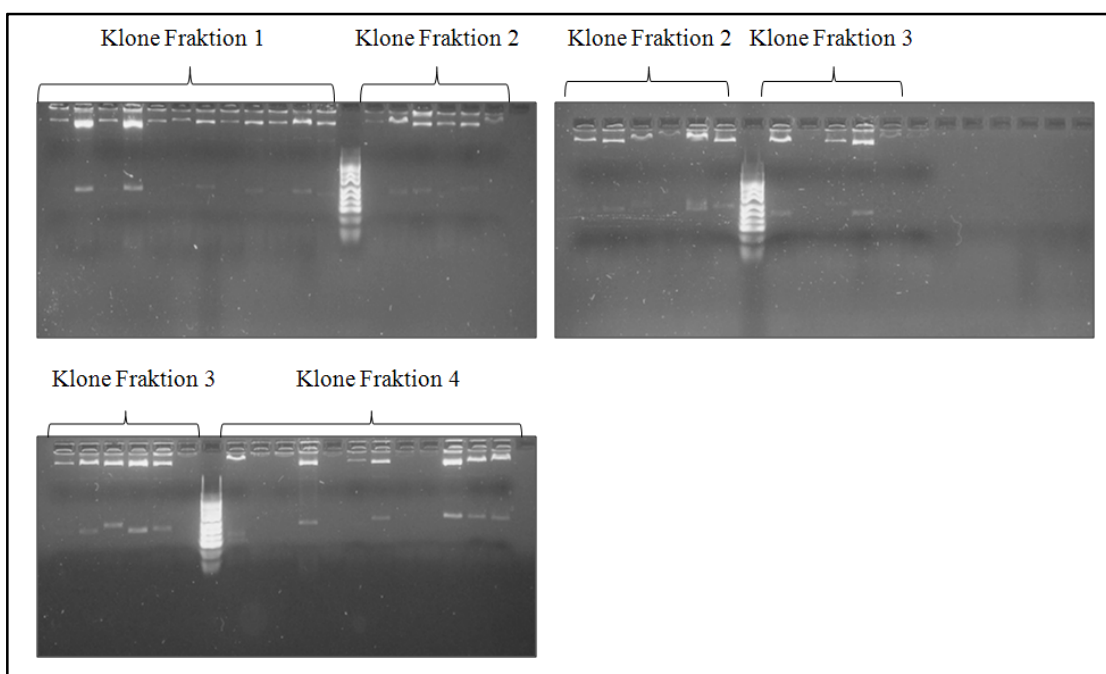


Abbildung 10:

Agarosegel des Restriktionsverdau der Plasmide ausgewählter Klone der EB Bibliotheken

Insert tragende pCR 2.1 Plasmide ausgewählter Klone wurden 2h durch die Restriktionsenzymen *Xba*I und *Bam*HI verdaut und anschließend auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde *puc19/Msp*I aufgetragen. Die einzelnen Klone unterscheiden sich in ihrer Fragmentlänge, wobei eine Zunahme der Länge von Fraktion 1 bis Fraktion 4 beobachtet werden kann

Ein Teil der Plasmide, bei denen ein Insert vorhanden war, wurden sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzinformationen wurden die Sequenzen der cDNA Inserts extrahiert und mit Hilfe von Genom-Datenbanken (NCBI Blast und UCSC Genome Browser) und ncRNA-Datenbanken (miRBase, fRNAdb) analysiert.

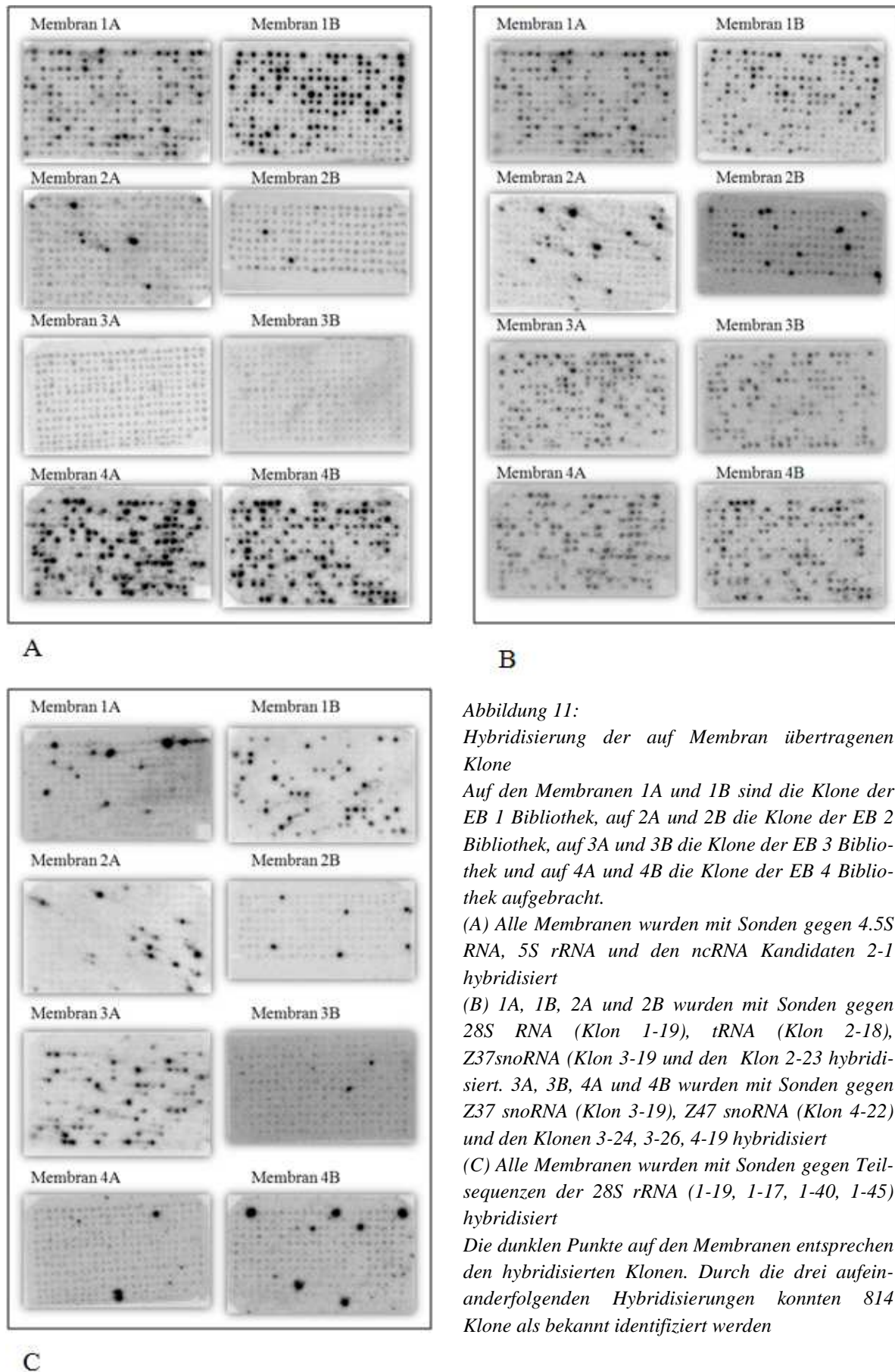


Abbildung 11:

Hybridisierung der auf Membran übertragenen Klone

Auf den Membranen 1A und 1B sind die Klone der EB 1 Bibliothek, auf 2A und 2B die Klone der EB 2 Bibliothek, auf 3A und 3B die Klone der EB 3 Bibliothek und auf 4A und 4B die Klone der EB 4 Bibliothek aufgebracht.

(A) Alle Membranen wurden mit Sonden gegen 4.5S RNA, 5S rRNA und den ncRNA Kandidaten 2-1 hybridisiert

(B) 1A, 1B, 2A und 2B wurden mit Sonden gegen 28S RNA (Klon 1-19), tRNA (Klon 2-18), Z37snoRNA (Klon 3-19 und den Klon 2-23 hybridisiert. 3A, 3B, 4A und 4B wurden mit Sonden gegen Z37 snoRNA (Klon 3-19), Z47 snoRNA (Klon 4-22) und den Klonen 3-24, 3-26, 4-19 hybridisiert

(C) Alle Membranen wurden mit Sonden gegen Teilsequenzen der 28S rRNA (1-19, 1-17, 1-40, 1-45) hybridisiert

Die dunklen Punkte auf den Membranen entsprechen den hybridisierten Klonen. Durch die drei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen konnten 814 Klone als bekannt identifiziert werden

Um auszuschließen, dass gleiche Inserts mehrfach sequenziert werden, wurden alle Klone auf Nylonmembranen übertragen und mit Sonden hybridisiert (vgl. Material und Methoden 3.2.8.2), deren Sequenz aus bereits ermittelten cDNA Sequenzen abgeleitet wurden. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Hybridisierungen zusammengestellt. Die Analyse der gesamten cDNA Bibliothek erfolgte im Wechsel zwischen Sequenzierung von Plasmiden und der Hybridisierung mit geeigneten Sonden. Durch Hybridisierung der Membran konnten 814 cDNA Sequenzen als bekannt identifiziert werden. 80 Plasmide wurden sequenziert.

Zehn der sequenzierten Plasmide enthalten kein oder ein unlesbares Inserts, sechs Sequenzen stimmen im Sequenzalignment nur mit künstlichen DNA Konstrukten überein und entsprechen somit Artefakten der Klonierung.

Alle anderen Sequenzen können bekannten ncRNAs oder neuen ncRNA Kandidaten zugeordnet werden, wobei es sich bei 51 cDNAs um Sequenzen bereits bekannte ncRNAs handelt. Am häufigsten kommen rRNA Sequenzen (26 Sequenzen) und snoRNA /snRNA Sequenzen (11 Sequenzen) vor. Die einzelnen rRNA und snoRNA Spezies sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Klasse	RNA	Anzahl der Sequenzen
rRNA	18S rRNA	6
	28S rRNA	18
	45S pre rRNA	1
	5S rRNA	1
snoRNA	U51 snoRNA	1
	MBII-55 snoRNA	1
	MBII-96 snoRNA	1
	U22 snoRNA	1
	U35A snoRNA	1
	Z37 snoRNA	6
snRNA	U14 snRNA	1
tRNA	Asp-tRNA, Gly-tRNA	1
andere	4.5S RNA	10

*Tabelle 3:
Bekannten ncRNA , die in der EB Bibliothek identifiziert wurden*

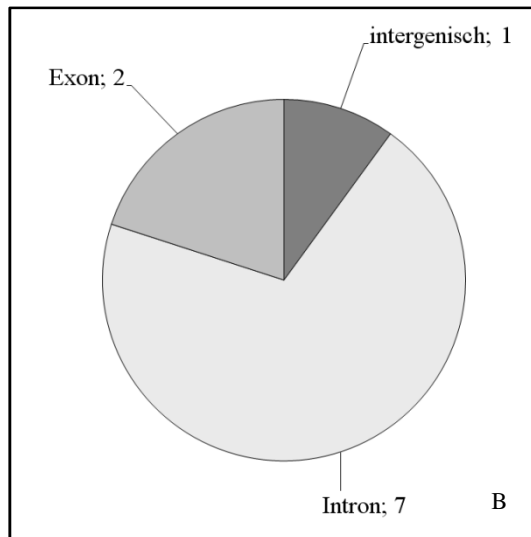
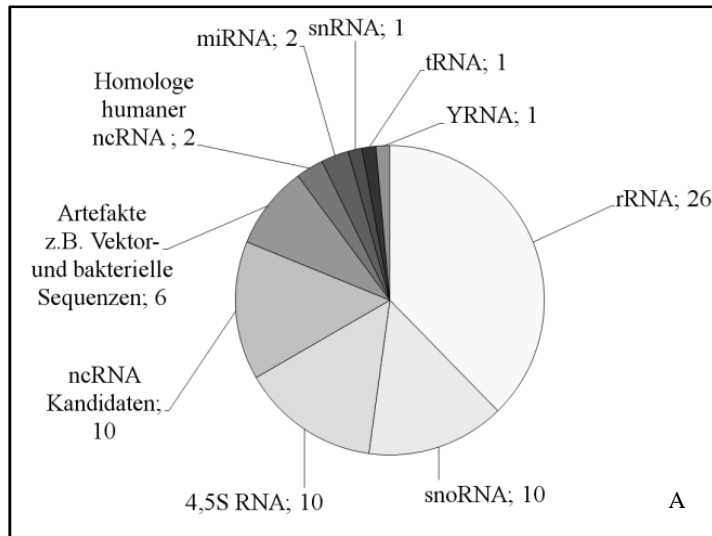


Abbildung 12:
Sequenzanalyse und genomische Lokalisation der ncRNA Kandidaten.
(A) Sequenzanalyse der 80 sequenzierten cDNA Klon der EB Bibliothek. Die cDNA Klone gehören zu unterschiedlichen Klassen, die Zahlen repräsentieren die Anzahl der einzelnen ermittelten Sequenzen.
(B) neuen ncRNA Kandidaten aufgeschlüsselt nach ihrer allgemeine genomische Lokalisation.

Aus zehn Plasmiden wurden Sequenzen ermittelt, die noch nicht als nicht-kodierende RNA bekannt sind. Davon liegen sieben in intronischem Bereichen des Genoms und zwei liegen in Exons. Eine ist intergenischen Ursprungs (Abb. 12).

4.4 Charakterisierung der neuer ncRNA Kandidaten und interessanter bekannter ncRNAs aus der EB Bibliothek

Die neuen ncRNA Kandidaten wurden mittels Sequenz-Datenbanken (NCBI GenBank, UCSC Genom Browser, fRNAdb, miRBase) charakterisiert. Die Sequenzen interessanter ncRNA Kandidaten wurden in die Sequenzdatenbank GenBank abgelegt. In Tabelle 4 sind die Sequenzen aller neuer ncRNA Kandidaten und einiger interessanter ncRNAs zusammengestellt. Abbildung 13 gibt einen Überblick über das genomische Umfeld der RNA Kandidaten. Die Expression aller neuen ncRNA Kandidaten und der beiden bekannten ncRNAs miR-690 und Y3 RNA, die in der EB Bibliothek detektiert werden konnten, wurde mittels Northern Blot Analyse, wie im Abschnitt Material und Methoden unter 3.2.9 beschrieben, untersucht. Die Northern Blot Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt. Um die Expression der ncRNAs in den verschiedenen Stadien der Differenzierung untersuchen zu können, wurde für den Northern Blot, neben der RNA aus ES Zellen und EBs auch RNA aus primären Neuronen und den beiden Zelllinien NIH3T3 und AtT-20 verwendet. Um zu unterscheiden, ob die neuen ncRNA Kandidaten ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind, wurde neben der nuklearen RNA Fraktion auch die zytoplasmatische RNA Fraktion untersucht.

Die meisten der neu identifizierten ncRNAs konnten im Northern Blot nicht detektiert werden. Einzig die Expression des RNA Kandidaten 2-57 ließ sich bestätigen. Wie zu erwarten, konnten die beiden bekannte ncRNAs miR-690 und Y3 RNA im Northern Blot detektiert werden und zeigten hier ein interessantes Expressionsmuster. Im Einzelnen werden die Ergebnisse der Northern Blots bei der Charakterisierung des jeweiligen RNA Kandidaten genauer beschrieben.

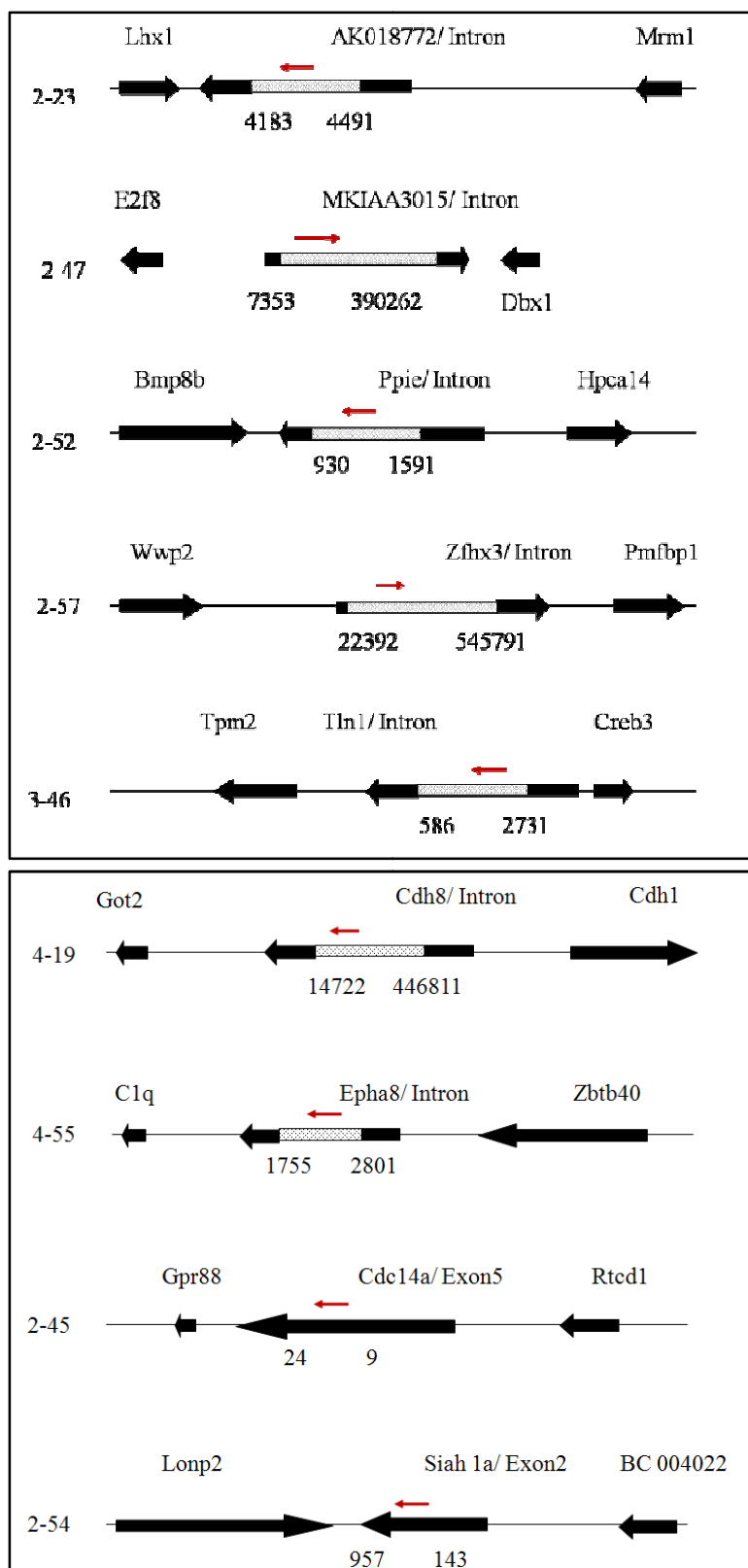


Abbildung 13:

Lage der neuen ncRNA Kandidaten der EB Bibliothek im Genom.

Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Neue ncRNA Kandidaten sind als rote Pfeile eingezeichnet, benachbarte Gene sind als schwarze Pfeile eingezeichnet. Introns sind schraffiert dargestellt, die Entfernung zum nächsten Exon (bei 2-45 und 2-54 zum nächsten Intron) ist als Zahl (in nt) eingezeichnet.

4.4.1 Unbekannte ncRNA Kandidaten intronischen Ursprungs

2-23

Beim Klon 2-23 handelt es sich um einen 57 nt langen RNA Kandidaten. Im Genom ist die Sequenz auf dem Plusstrang des Chromosoms 11 lokalisiert. Sie liegt im intronischen Bereich des Mausgens *AK018772*. Die Orientierung des Gens und der ncRNA verläuft in identische Richtung (Abb. 13). *AK018772* kodiert für ein nicht klassifiziertes Produkt und wurde ursprünglich in einer cDNA Bibliothek aus Mäusecerebellum identifiziert. (Mus musculus adult male cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 1500016L03) Der Bereich des Introns, indem der ncRNA Kandidat 2-23 lokalisiert ist, ist zwischen verschiedenen Säugetieren stark konserviert. Insgesamt umfasst der konservierte Bereich etwa 250 nt.

2-47

Bei der cDNA Sequenz 2-47 handelt es sich um einen 61 nt langen RNA Kandidaten, der auf dem Plusstrang von Chromosom 7 zu finden ist. 2-47 liegt im Intron 1 des murinen *Nav2* (neuron navigator 2) Gens. Die Orientierung des Gens und des RNA Kandidaten im Genom ist identisch. (Abb. 13) Über das humane *Nav2* ist bekannt, dass seine Expression durch all-trans Retinolsäure gesteuert wird und dass es für die axoniale Elongation von Neuronen benötigt wird. (Muley et al, 2008)

2-52

Der RNA Kandidat 2-52 ist 66 nt lang und liegt auf dem Minusstrang des Chromosoms 4. Die Sequenz ist in Intron 8 des Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase E (*Ppie*) Gens lokalisiert. Die Orientierung des Gens und des RNA Kandidaten im Genom verläuft in gleicher Richtung. (Abb. 13) *Ppie*, auch als Cyclophilin 33 bezeichnet, ist ein nukleares Proteinen, dass sowohl RNA Bindungsaktivität, als auch Peptidyl-prolyl-Isomeraseaktivität besitzt. (Mi et al., 1996)

2-57

2-57 ist der interessanteste aller neuen RNA Kandidaten. In der cDNA Bibliothek konnte eine 61 nt große Sequenz identifiziert werden. Sie ist auf Chromosom 8 in Intron 1 des Zinkfinger homeobox 3 (*Zfhx3*) Gens lokalisiert. Sowohl das *Zfhx3* Gen, als auch die Sequenz des RNA Kandidaten 2-57 ist auf dem Plusstrang der DNA zu finden. (Abb. 13). Über den Transkriptionsfaktor *Zfhx3*, manchmal auch als AT Bindungsfaktor 1 (*Atbf1*) bezeichnet, ist bekannt, dass er AT-reiche Elemente des alpha-Fetoproteins herunter reguliert. Außerdem weiß man, dass *Zfhx3* ein Regulator der Stat3 vermittelten Signaltransduktion ist. Da die Expression von *Zfhx3* im sich entwickelnden Gehirn sehr hoch ist, nimmt man an, dass es an der neuronal Entwicklung beteiligt sein könnte. (Ido et al., 1996; Nojiri et al. 2004; Jung et al. 2005)

Wie oben schon angedeutet, kann 2-57 im Northern Blot nachgewiesen werden, wobei zwei Banden detektiert werden können. Die schwächer ausgeprägte Bande ist etwa 200 nt lang, die Stärkere liegt im Bereich von 120 nt. 2-57 ist sowohl im Zytoplasma als auch in Zellkern nachweisbar. Die detektierten Expression ist jedoch in den zytoplasmatischen RNA-Fraktionen haben deutlich stärker als in den nuklearen Fraktionen.

In der aus EBs isolierten RNA kann 2-57 durchgehend in allen durchgeführten Northern Blots Experimenten detektiert werden. (Abb. 14 und 15) Zusätzlich kann 2-57 in einzelnen Blots auch im nuklearen RNA Extrakt der AtT-20 Zelllinie nachgewiesen werden. Sowohl in EBs, als auch in AtT-20 Zellen findet man beide detektierbare Banden. In den anderen Proben ist entweder überhaupt keine oder nur die 200 nt lange Bande schwach sichtbar. (Abb. 14 und 15) In ES Zellen ist 2-57 nur wenig exprimiert, wobei in einer Probe der zytoplasmatischen Fraktion ein deutlich stärkeres Signal zu erkennen ist (Abb.14), als in den restlichen RNA Proben aus ES Zellen. Da diese Probe auch bei der Hybridisierung mit Sonden gegen miR-690 und Y3 RNA eher dem Expressionmuster von EBs gleicht, ist zu anzunehmen, dass dieser Fehler im Northern Blot Ergebnis auf eine teilweise Differenzierung der Stammzellpopulation zurückgeführt werden kann, die der RNA Probe zugrunde liegt. In primären Neuronen kann keine Expression von 2-57 nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die in der Northern Blot Analyse detektierte Expression des ncRNA Kandidaten 2-57 in gleicher Weise reguliert ist, wie die des *Zfhx3* Gen, wurde aus den unterschiedlichen Zelllinien, die schon in den Northern Blot Experimenten Verwendung fanden, Gesamt-RNA isoliert. Hieraus wurde mittels RT PCR semiquantitativ die Expression der *Zfhx3* mRNA ermittelt. (Abb. 16) Die Expression der *Zfhx3* mRNA ähnelt

der des ncRNA Kandidaten 2-57. Auch *Zfhx3* ist in den EBs deutlich stärker exprimiert, als in allen anderen Zelllinien. ES Zellen zeigen im Vergleich dazu nur eine schwache *Zfhx3* Expression. *Zfhx3* kann aber im Gegensatz zu 2-57 in allen Zelllinien nachgewiesen werden, auch in primären Neuronen, in denen jedoch die Expression nur sehr schwach ausgeprägt ist. Einzig in NIH3T3 Zellen unterscheidet sich die Expression von *Zfhx3* und 2-57 klar. Während im Northern Blot in NIH3T3 Zellen 2-57 nur schwach exprimiert war, ist das *Zfhx3* Gen hier deutlich exprimiert.

3-46

Die cDNA Sequenz 3-46 ist 82 nt lang und kann auf Chromosom 4 lokalisiert werden. Sie befindet sich in Intron 17 des Talin1 (*Tln1*) Gens, das, genau wie die 3-46 Sequenz, auf dem Minusstrang orientiert ist. (Abb. 13) *Tln1* ist ein Protein des Zytoskeletts. Es spielt bei der fokalen Adhäsion und der Zellmigration eine Rolle. (Priddle et al., 1998) Die cDNA Sequenz 3-46 liegt, zumindest teilweise, in einem genomischen Bereich, der zwischen verschiedenen Säugetieren stark konserviert ist.

4-55

Bei Klon 4-55 handelt es sich um einen 60 nt langen RNA Kandidaten. Die Sequenz befindet sich auf Chromosom 4 in Intron 5 des Ephrin Rezeptor A8 Gens (*Epha8*). Sowohl die cDNA Sequenz als auch das *Epha8* Gen sind auf dem Minusstrang der DNA lokalisiert. (Abb. 13) Ein Teil der Sequenz überschneidet sich mit einem DNA Bereich, der zwischen verschiedenen Säugetieren konserviert ist. Bei *Epha8* handelt es sich um einen Tyrosinkinase Rezeptor der Ephrin A Familie. (Choi et al., 1999)

4-19

Die cDNA Sequenz 4-19 ist 74 nt lang und ist auf dem Minusstrang des Chromosoms 8 lokalisiert. Es handelt sich um ein Transkript, dass in Intron 7 des Cadherin 8 (*Cdh8*) Gens angesiedelt ist. Die genomische Orientierung von *Cdh8* und dem RNA Kandidaten 4-19 ist gleich. (Abb. 13) *Cdh8* ist ein Membranprotein, das im Gehirn exprimiert wird und die Kalzium-abhängige Zellmigration vermittelt. Außerdem scheint es eine wichtige

Rolle bei der Ausbildung des dendritischen Dorns zu spielen. (Kido et al 1998; Taniguchi et al., 2006)

4.4.2 Unbekannte ncRNA Kandidaten exonischen und intergenischen Ursprungs

2-45

Die cDNA Sequenz 2-45 ist auf dem Minusstrang des Chromosoms 3 lokalisiert. Die Sequenz liegt im Exon 5 des *Cdc14a* (cell division cycle 14 homolog A) Gens. (Abb. 13) Da 2-45 im proteinkodierenden Bereich des Cdc14a liegt, handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt der *Cdc14a* mRNA, das bei der Klonierung zusammen mit ncRNA Molekülen erfasst wurde.

2-54

Der RNA Kandidat 2-54 ist 63 nt lang. Bei der Blast-Analyse konnten homologe Sequenzen auf drei Chromosomen gefunden werden. Auf Chromosom 8 und dem X Chromosom befindet sich die Sequenz im kodierenden Bereich des *Siah1b* Gens (seven in absentia 1b). (Abb. 13) Siah1b ist evolutionär konserviert und wird in apoptotischen Zellen aktiviert. Es scheint eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Vertebraten zu spielen. Auf Chromosom 15 kann die Sequenz dem Gen *AK009791* zugeordnet werden. Hier liegt 2-54 in einem intronischen Bereich, der stark konserviert ist. Der gesamte konservierte Bereich ist etwa 250nt lang, wobei im Bereich der cDNA Sequenz 2-54 die stärkste Konservierung vorliegt. *AK009791* wurde zuerst in einer cDNA Bibliothek (Mus musculus adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library) identifiziert. Das eigentliche Produkt der mRNA konnte noch nicht identifiziert werden.

1-5

Die RNA 1-5 ist 135 nt lang. Durch Blast-Analyse konnte im Mausgenom keine homologe Sequenz wiedergefunden werden. Die Sequenz findet sich aber auf Chromosom 8 im menschlichen Genom wieder. Die Region ist weder konserviert, noch befinden sich in der Nähe irgendwelche Gene.

4.4.3 ncRNAs mit Homologie zu humanen ncRNAs

Bei den beiden im Folgenden beschriebenen Sequenzen handelt es sich um bereits bekannte ncRNA Moleküle. Beide sind homologe humaner ncRNAs, deren cDNA Sequenz jedoch nicht in Sequenzdatenbanken abgelegt sind, so dass so bis jetzt nur durch Sequenzhomologie vorhergesagt sind.

3-24

Die cDNA Sequenz 3-24 ist 70 nt lang. Die Sequenz liegt in einem intronischen Bereich des eukaryotischen Translationselongationsfaktor 1 beta (*Eef1b2*) Gen. Sowohl die cDNA Sequenz als auch das Gen liegen auf dem Plusstrang der DNA. Über die gesamte Länge des Transkriptes 3-24 ist der besagte DNA Abschnitt stark konserviert. Durch den Vergleich mit anderen Organismen konnte eine Sequenzhomologie zur humanen U51snoRNA festgestellt werden. Bei U51snoRNA handelt es sich um eine snoRNA aus der Klasse der C/D Box snoRNAs.

4-22

Die cDNA Sequenz 4-22 ist 99 nt lang. Die Sequenz kann in stark konservierten DNA Bereichen auf Chromosom 12 sowohl auf dem Plus-, als auch dem Minusstrang der DNA gefunden werden. Die Sequenz überschneidet sich mit der Sequenz des vorhergesagten nichtkodierenden Transkript *ENSMUST00000122743*. Das vorhergesagte Transkript ist 297 nt lang, so dass die in der cDNA Bibliothek ermittelte Sequenz nur ein Drittel der eigentlichen Länge umfasst. Beim Vergleich dieses Transkripts mit anderen Organismen, zeigt sich, dass eine Sequenzhomologie zur humanen 7SL RNA besteht. 7SL RNA ist ein Bestandteil des eukaryotischen Signalerkennungs-Partikel (SRP).

2.4.4 Bekannte ncRNA mit einer regulierten Expression während der Differenzierung

1-2 und 2-1

Die RNA Kandidaten 1-2 und 2-1 sind 54 bzw. 57 nt lang. Es handelt sich bei diesen beiden Sequenzen um Bruchstücke der mmu-miR-690 Vorläufer-Haarnadelstruktur (pre-miR-690; MI0004658). Die Gesamtlänge der Haarnadelstruktur beträgt 109 nt.

Mit Sonden gegen beide RNA Bruchstücke kann pre-miR-690 im Northern Blot nachgewiesen werden. In Abbildung 14 und 15 ist der Blot dargestellt, der mit der Sonde gegen die Sequenz des RNA Kandidaten 2-1 hybridisiert wurde. Pre-miR-690 ist sowohl in den RNA Fraktionen des Zytoplasma, als auch denen des Zellkern detektierbar. Das Signal in der Nukleusfraktion ist stärker ausgeprägt, als das in der Zytoplasmafraktion. Dies entspricht den Erwartungen, da pre-miRNA Vorläufermoleküle im Zytoplasma zu reifer miRNA prozessiert werden und deshalb im Zytoplasma weniger stark exprimiert sein sollten. Gleichzeitig ist die Bildung reifer miRNA zu erwarten. Unter den von mir verwendeten Hybridisierungsbedingungen konnte jedoch keine reife miRNA detektiert werden. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung der Ergebnisse von Tang et. al. (Tang et al., 2007), die im Northern Blot gegen miR-690 auch ausschließlich die pre-miRNA Form detektieren konnten. Insgesamt kann pre-miR-690 in den hier aufgeführten Experimenten in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, wobei in den RNA Isolaten aus EBs ein etwas schwächeres Signal nachzuweisen ist, als in dem aus ES Zellen und den Zelllinien AtT-20 und NIH3T3. (Abb. 14). Im Gesamt-RNA Extrakt aus primären Neuronen ist pre-miR-690 interessanterweise deutlich am Höchsten exprimiert. (Abb. 15)

4-56

Die cDNA 4-56 entspricht mit 108 nt der Gesamtlänge der Y3 scRNA. Y3 RNA ist auf dem Plusstrang von Chromosom 6 kodiert. Die eigentliche Ro60 assoziierte Y3 RNA Sequenz ist laut NCBI Datenbank 101 nt lang. Die Sequenz 4-56 ist stark konserviert und entspricht in ihrer Länge und Lage einem RNA Repeat. Y3 RNA gehört zu den Y scRNAs, einer Klasse kleiner zytoplasmatischer RNA, die mit dem Ro60 Protein assoziiert vorkommen und an der RNA Qualitätskontrolle und der DNA Replikation beteiligt sind. (Pruijn et al., 1993; Perreault et al. 2007)

Im Northern Blot kann 4-56 erwartungsgemäß detektiert werden. Interessanterweise werden zwei Banden sichtbar. Zum einen eine Bande mit einer Länge von etwa 115 nt. Diese kann sowohl in den nuklearen, als auch den zytoplasmatischen Fraktionen aller untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Intensität des Signals ist in den zytoplasmatischen Fraktionen jedoch deutlich stärker, als in denen des Zellkerns. In der EB Probe ist die Expression von Y3 RNA relativ schwach ausgeprägt, in ES Zellen, AtT-20 und NIH3T3 hingegen ist sie deutlich stärker. (Abb. 14).

Die Expression in primären Neuronen ist sehr viel stärker ausgeprägt, als in den anderen untersuchten Zelllinien. (Abb.15) Der Unterschied in der Expression zwischen ES Zellen, EBs, AtT-20 und NIH3T3 ist in diesem Blot jedoch nur weniger stark ausgeprägt. Die zweite Bande, mit einer Größe von etwa 60 nt, ist ausschließlich in den nuklearen Fraktionen sichtbar. Sie ist relativ schwach ausgeprägt, taucht aber in allen Zelllinien in ähnlicher Intensität auf.

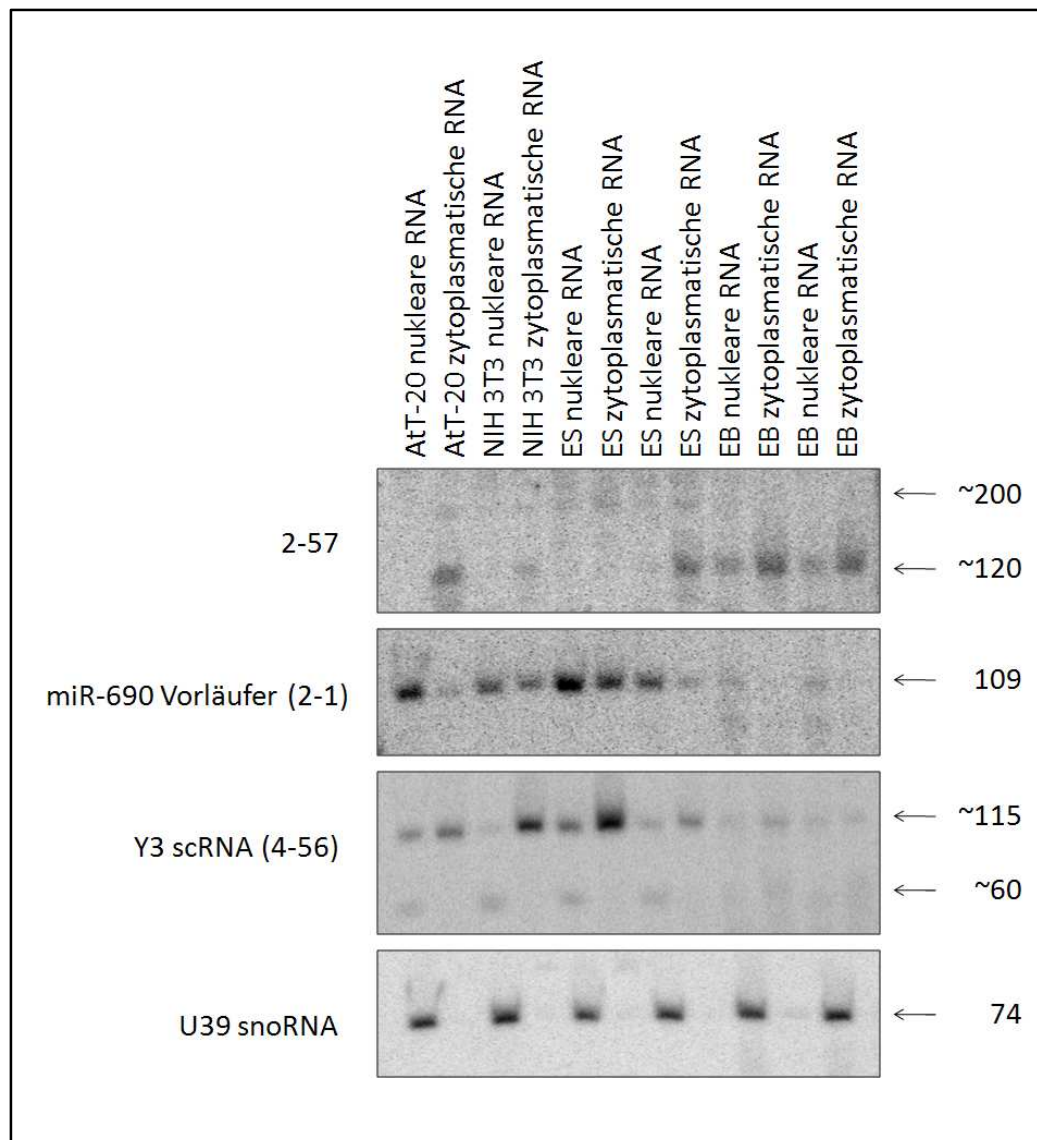


Abbildung 14:

Northern Blot Analyse ausgewählter ncRNAs.

Jede Band enthält 30µg RNA, die aus Zellkernen oder dem Zytoplasma verschiedener Zelllinien AtT-20 (Hypophysenzelllinie) NIH3T3 (embryonale Fibroblasten), ES Zellen und EBs) isoliert wurde.

Die Namen der Klone sind auf der linken Seite angegeben. Die Größe der RNA wurde mittels Standard bestimmt und ist auf der rechten Seite angegeben.

Als Referenz ist die Hybridisierung gegen U39 snoRNA dargestellt.

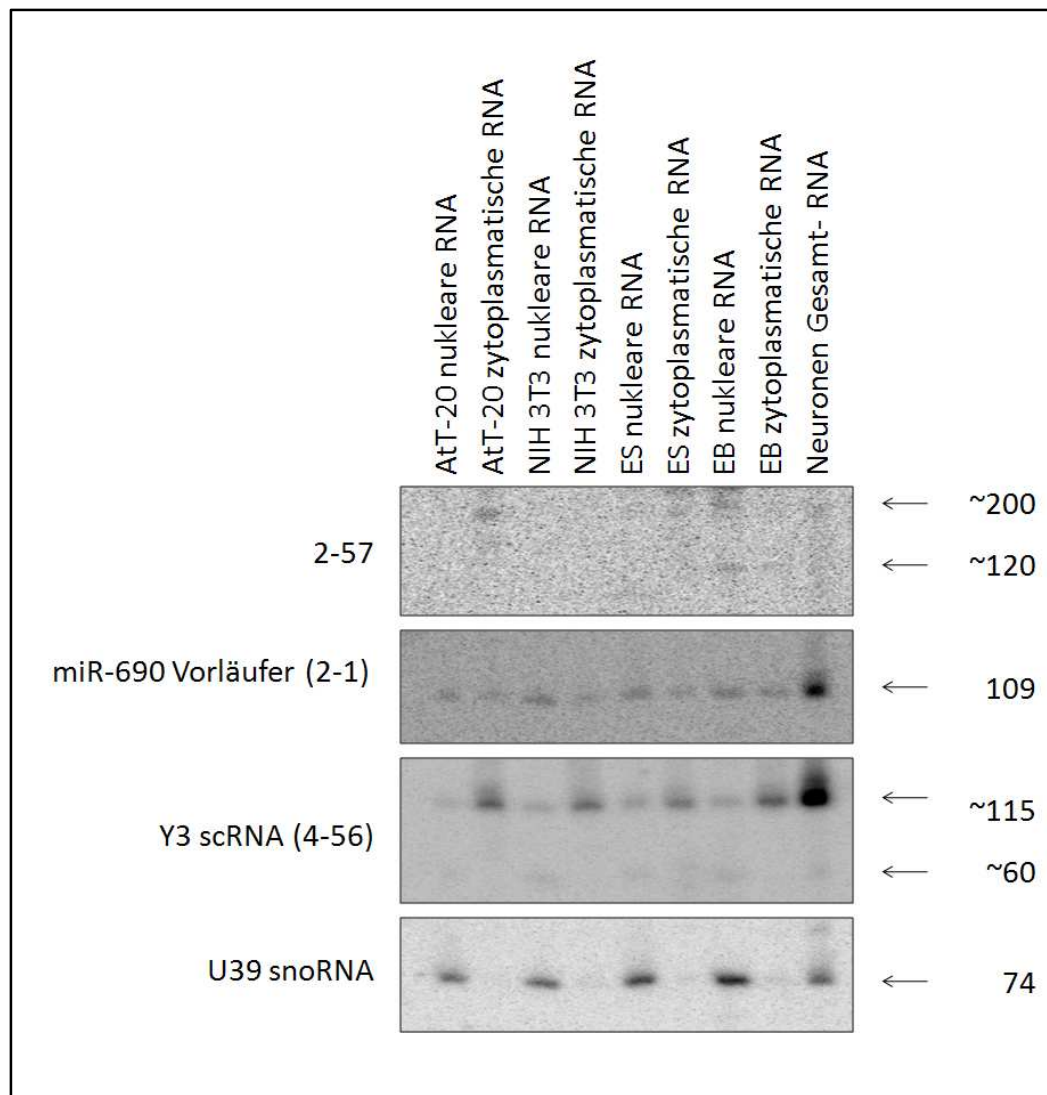


Abbildung 15:

Northern Blot Analyse ausgewählter ncRNAs.

Jede Band enthält 20µg RNA, die aus Zellkernen oder dem Zytoplasma verschiedener Zelllinien AtT-20 (Hypophysenzelllinie) NIH3T3 (embryonale Fibroblasten), ES Zellen, EBs und primären Neuronen stammt.

Die Namen der Klone sind auf der linken Seite angegeben. Die Größe der RNA wurde mittels Standard bestimmt und ist auf der rechten Seite angegeben.

Als Referenz ist die Hybridisierung gegen U39 snoRNA dargestellt

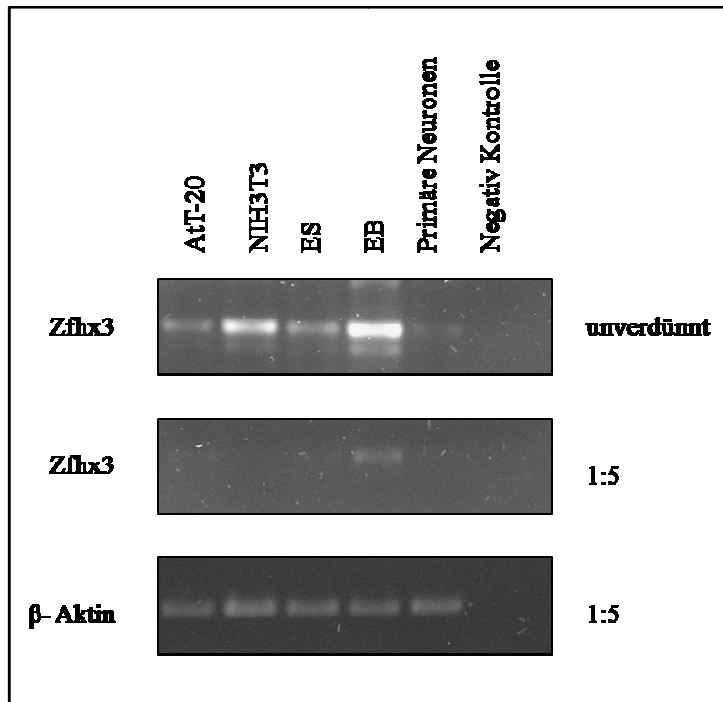


Abbildung 16:

Expression des Zfhx3 Gens in den verschiedenen Zelllinien

Die Expression des Zfhx3 Gens in AtT-20 (Hypophysenzelllinie) NIH 3T3 (embryonale Fibroblasten), ES Zellen, EBs und primären Neuronen wurde mit RT PCR bestimmt. In EBs ist Zfhx3 deutlich stärker exprimiert, als in den anderen Zellen. In primären Neuronen ist Zfhx3 nur sehr schwach exprimiert. Als Referenz ist die Expression von β -Aktin gezeigt, die in allen Proben annähernd gleich ist.

Tabelle 4:
ncRNA Kandidaten und interessante ncRNAs aus der EB Bibliothek

Interessante bekannte ncRNAs bzw. homologe humane ncRNAs					
Klon	Accession Nummer	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
1-2	-	TGCA GAGA TG GCT CAG GCG TTA AA GG CT AG CT CAA CAA CCAA AAAA TCCG CCCC	54	EB 1	mmu-rf1R-690 Vorläufer
2-1	-	GGG GTT GGAG AGA TG GNT CA GCC GTT AA AG TT AG GTT CACA ACCA AAA AAAA ATAT	57	EB 2	mmu-rf1R-690 Vorläufer
3-24	-	GGTACA TGATGAA TAA AATCAA ATCA CCA TCTT TCG GN TGA GCTAC CTGATG GATT TGCTTT TCTGAT A	70	EB 3	Chr. 1, Intron Eef1b2, homolog zur humane U51 snRNA
4-22	-	GGAGCA GGTC AAAAC TC CCGT GCT GA TCA CT A3 TG GGA TCCG GCTTG TGA ATAG CCAC TCCAC TCCAG CCGTGGCA ACATAG CGAG ACCCGTCTCTTA	99	EB 4	Chr. 12, intergenisch, homolog zur humane 7SL RNA
4-56	-	GGTTG3 TCCGAGAGTAG TUGTGTTTACACIATTTGAT CACA ACCAGTTACAGAT TTTCTTGTCTCTCCGCTCC CACTG3 TTCAC TTGAC CAGCCTTAAAA AAAA	108	EB 4	Y3 scRNA
neue ncRNA Kandidaten mit humaner Lobalbenen					
Klon	Accession Nummer	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
2-22	EU827529	GGAAAA CCTGTGACGAGTGCTGGCGAGGAATCCAACT AATGAAATAAACGTCATAAGA	57	EB 2	Chr. 11, Intron AK018772
2-47	-	CTNGCTGACAGCTTAACNCCAGCCGAAGCTCCTAAGAC GCNCNAGTTAAAGGTAA TTTCTNAACCTATG	66	EB 2	Chr. 7, Intron Nav2
2-52	EU827530	GGGATTAAAGGCGTACACCAACATACCTGCTTTGCTTT TTGAAA CTGGGCTCTTAGACTGTGACTCA	66	EB 2	Chr. 4, Intron Pyle

2-57	EU827532	GAAGAACAGTGGCTTCTGCCCTCAGATCCTTAGAATCG TCAGCTCAGAAAGCCCATTCCTTA	61	EB 2	Chr. 8, Intron Zfhx3
3-46	EU827533	AGGATGATGTCCTTCGAGCTACCCCTTCCCTTCCCCAC CCCAGCCAAAGTTGCCCTCAGCTGACTTTTCACCCCTGGATT TCCA	82	EB 3	Chr. 4, Intron Tln1
4-19	EU827534	GGAAAGGACAGTCTCAAANGATAGTCTGGACTTTTACC ATCATTAACATAAATATATCATAGNCTGTAAATGATGA	74	EB 4	Chr. 8, Intron Cdh8
4-55	EU827535	AGAGAGAGGGGAGATCACTCAGTCCAGCAGCTGACAC CGGAGTCTAACCTTAAGCCCAAG	60	EB 4	Chr. 5, Intron EphA8
neue ncRNA Kandidaten lokalisiert in Exons bekannter Gene					
Klon	Accession Numm er	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
2-45	-	CTTAAAGAAGACACCAGAAAGAAGCGTACAGAGCTCTC CTGTCTGGCTCAAA	51	EB 2	Exon, Cde14A
2-54	EU827531	GCGAGCGGGGTTGCCACCTATTCTTCAGTGTTCAGAGTG GCCATCTTGTGTTGTAGCAACTGTCTG	63	EB 2	Exon, Shiah1b
neue ncRNA Kandidaten mit intergenischer Lokalisation					
Klon	Accession Numm er	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
1-5	-	CCTCTCCCTCCATGTGAGGGTGT CAGGCC'CCCGGGGG TGAATTCGCTCCCTCTCCCTCCATGCTGAGGGTGT CAG GCCCTCGGGGGTGAATTGGCTCCCTCTCCCTCCATGTT GAGGGTGT CAGACCCCC	133	EB 1	Homologie zu einer Region auf Chr. 8 des humanen Genoms

4.5 Analyse der Bibliotheken aus ES Zellen

Mit insgesamt nur 80 Klonen enthält die erste Bibliothek aus ES Zellen deutlich weniger Sequenzen, als die im vorherigen Abschnitt beschriebene EB Bibliothek. Die beiden Teilbibliotheken bestehen deshalb nur 49 cDNA Sequenzen in der ES-M Bibliothek und 31 cDNA Sequenzen in der ES-L Bibliothek. Die zweite Bibliothek aus ES Zellen umfasst weitere 192 Klone, von denen je 64 auf die einzelnen Fraktionen ES-S, ES-M und ES-L entfallen.

Die Analyse der ES Bibliotheken wurde, wie für die EB Bibliothek bereits beschrieben, durchgeführt. Aus jeder Bibliothek wurden einige Klone zufällig ausgewählt, aus denen das Plasmid isoliert wurde. Mittels Kolonien PCR wurde überprüft, ob die Plasmide tatsächlich ein Insert tragen. (vgl. Material und Methoden 3.2.8.1) Ein Teil der Plasmide, die ein Insert tragen, wurden sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzeninformationen wurden die Sequenzen der cDNA Inserts extrahiert und mit Hilfe von Genom-Datenbanken (NCBI Blast und UCSC Genome Browser) und ncRNA-Datenbanken (miRBase, RNAdb) analysiert.

Um auszuschließen, dass gleiche Inserts mehrfach sequenziert werden, wurden alle Klone auf Nylonmembranen übertragen und mit DNA-Sonden hybridisiert, deren Sequenz aus bereits ermittelten cDNA Sequenzen abgeleitet wurden. Da die Gesamtanzahl der Klone in der ES Bibliothek relativ klein war, wurde, im Gegensatz zu den EB Bibliotheken, hierfür nicht das Kolonien-Transfer-Verfahren, sondern die Dot Blot Technik verwendet, bei der bereits gereinigte Plasmide direkt auf die Membran gespottet werden. (Material und Methoden 3.2.8.3) Abbildung 17 zeigt beispielhaft eine solche Membran nach der Hybridisierung.

Zur Auswertung wurden die beiden ES Bibliotheken zu einer Gesamtbibliothek mit insgesamt 352 cDNA Sequenzen zusammengefasst. Von diesen 352 cDNA Sequenzen konnten durch die Hybridisierung 178 cDNA Sequenzen als bekannt identifiziert werden. 32 Plasmide wurden sequenziert.

Drei der sequenzierten Plasmide enthalten kein Inserts. Für drei Sequenzen können in den Genomdatenbanken nur Übereinstimmungen mit künstlichen DNA Konstrukten gefunden werden. Bei diesen Sequenzen handelt es sich wahrscheinlich um Artefakte, die bei der Klonierung entstanden sind.

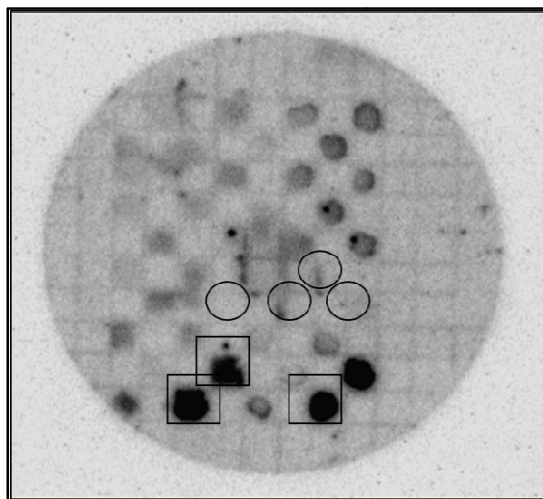


Abbildung 17:
Hybridisierung der auf Membran übertragenen Plasmide
Die einzelnen Plasmide wurden auf die Membran aufgebracht und mittels UV crosslinker fixiert. Zur Hybridisierung wurden Sonden gegen die künstlichen DNA Konstrukte (ES4), 5S rRNA und U39 snoRNA verwendet. Hybridisierte Proben lassen sich anhand der dunklen Färbung erkennen. Nicht hybridisierte Proben sind mit einem Kreis gekennzeichnet. Rechtecke kennzeichnen die Positivkontrollen

Alle anderen Sequenzen können bekannten ncRNAs oder neuen ncRNA Kandidaten zugeordnet werden, wobei es sich bei 22 cDNAs um Sequenzen bereits bekannte ncRNAs handelt. Unter den bekannten ncRNAs konnten rRNA Sequenzen (13 Sequenzen), snoRNA /snRNA Sequenzen (8 Sequenzen) und eine tRNA Sequenz identifiziert werden. Um welche ncRNA Spezies es sich im Einzelnen handelt ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Klasse	RNA	Anzahl der Sequenzen
rRNA	5S rRNA	10
	28S rRNA	3
snoRNA	U44 snoRNA	1
	U52 snoRNA/ MBII-297	1
	Z37 snoRNA	2
snRNA	U3A snRNA	1
	U3B snRNA	3
tRNA	Asp-tRNA	1

Tabelle 5:
Bekannten ncRNA , die in der ES Bibliothek identifiziert wurden

Vier Sequenzen können keinen bekannten ncRNAs zugeordnet werden. Zwei dieser cDNA Sequenzen 2-6 und 2-7 sind mit 24 nt bzw. 30 nt relativ kurz. Beide Sequenzen können nicht eindeutig einem Bereich im Genom zugeordnet werden. Zwei weitere cDNA Sequenzen wurden ermittelt, die noch nicht als nicht-kodierende RNA bekannt sind und deren Sequenz in intronischem Bereich des Genoms lokalisiert ist.

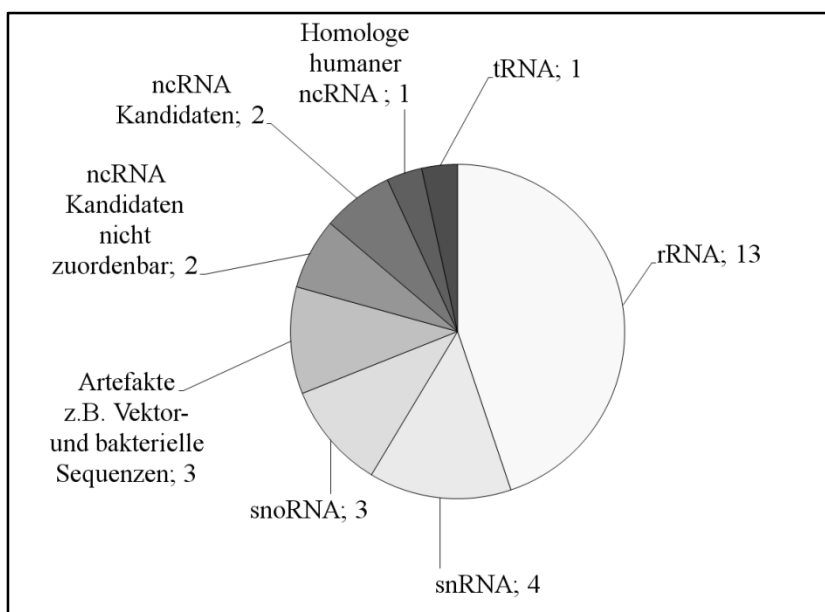


Abbildung 18:

Sequenzanalyse und genomische Lokalisation der ncRNA Kandidaten. Sequenzanalyse der 32 sequenzierten cDNA Klon der ES Bibliothek. Die cDNA Klone gehören zu unterschiedlichen ncRNA Klassen, die Zahlen repräsentieren die Anzahl der einzelnen ermittelten Sequenzen.

4.6 Charakterisierung neuer ncRNA Kandidaten aus der ES Bibliothek

Die neuen ncRNA Kandidaten wurden, wie schon bei der EB Bibliothek beschrieben durch Vergleich mit Genom- und RNA- Datenbanken charakterisiert. Tabelle 6 gibt einen Überblick über neu identifizierte ncRNA Kandidaten. In Abbildung 18 ist graphisch das genomische Umfeld der RNA Kandidaten T1-21 und T1-27 zusammengefasst. Die Sequenzen der beiden ncRNA Kandidaten wurde in der Sequenzdatenbank Genbank abgelegt.

Die Expression von T1-21 und T1-27 wurde mittels Northern Blot Analyse untersucht. Keiner der ncRNA Kandidaten konnten jedoch detektiert werden.

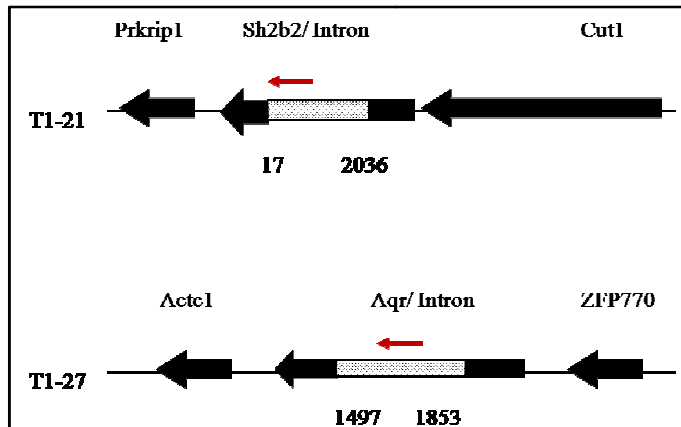


Abbildung 19:

Lage der neuen ncRNA Kandidaten der ES Bibliothek auf dem Genom.

Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Neue ncRNA Kandidaten sind als rote Pfeile eingezeichnet, benachbarte Gene sind als schwarze Pfeile eingezeichnet. Introns sind schraffiert dargestellt, die Entfernung zum nächsten Exon ist als Zahl (in nt) eingezeichnet.

T1-21

T1-21 kann in der ersten der beiden cDNA Bibliotheken in der Fraktion ES-M identifiziert werden. Die identifizierte cDNA ist 46 nt lang und ist auf Chromosom 5 angeordnet. T1-21 liegt im Intron 6 des Gens *Aps* (Sh2b2 Adaptor). Sowohl das Gen, als auch der ncRNA Kandidat sind auf dem Minusstrang lokalisiert. (Abb.19) *Aps* ist ein Adapterprotein mit einer PH (pleckstrin homology) und einer SH2 (Src homology 2) Domäne, das stark im Gehirn exprimiert wird, aber auch in der Milz, der Niere und der Muskulatur vorkommt. (Moodie et al., 1999; Iseki et al.2000)

T1-27

Auch T1-27 kann in der ersten der beiden cDNA Bibliotheken in der Fraktion ES-M identifiziert. Die cDNA hat eine Länge von 46 Nukleotiden und liegt im Intron 9 des Gens *Aquarius* (*Aqr*) auf Chromosom 2. (Abb.19) *Aqr* wird in ES Zellen durch die Zugabe von Retinolsäure induziert. Das humane homologe Protein IBP160 ist ein Intron bindendes Protein, das Bestandteil des splisosomal C1 Komplexes ist. Es ist an der Prozessierung intronkodierter C/D Box snoRNAs beteiligt. (Sam et al., 1998; Hirose et al. 2006)

Tabelle 5:
ncRNA Kandidaten und interessante ncRNAs aus der EB Bibliothek

neue ncRNA Kandidaten, Intron					
Klon	Accession Nummer	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
T1-21	EU827537	ATCTTCACTAACTTCTCTGTCTTCTCTCTGACCTTCT GTCCCTGTG	46	ES-M	Chr. 5, Intron Sh2b2
T1-27	EU827538	ATCCTTGGCTGCTTGCTTCTCTTTCCCTCAGTTTATC TCTTAGAG	46	ES-M	Chr. 2, Intron Aqr
neue ncRNA Kandidaten, nicht zuordenbar					
Klon	Accession Nummer	Sequenz 5' - 3'	Länge (nt)	Bibliothek	Beschreibung
2-6		GATGACGACAAAGCATCATCCTGG	24	ES-M	
2-7		CTCGCAGGGAGAACTCTGCCGATCCTCCAG	30	ES-M	

4.7 Vergleich der ncRNAs aus ES Zellen und EBs

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus ES Zellen und EBs ncRNA Bibliotheken nuklearer RNA erstellt werden. Der Umfang an identifizierten Sequenzen innerhalb der beiden Bibliotheken unterscheidet sich deutlich. Der Sequenzumfang liegt in der ES Bibliothek bei etwa einem Zehntel der EB Bibliothek. Beide Bibliotheken enthalten eine Reihe ubiquitär vorkommender, bekannter ncRNA Moleküle. Trotz des absoluten Unterschieds im Bibliotheksumfang ist prozentual gesehen die Verteilung bekannter ncRNAs in beiden Bibliotheken ähnlich. Neben den bekannter ncRNAs enthalten beide cDNA Bibliotheken auch neue ncRNA Kandidaten. Alle neuen ncRNAs entsprechen in ihrer sequenzierter Länge in etwa der vorgegeben Größenfraktionierung. Innerhalb der Gruppe der hier neu charakterisierten ncRNAs kommt es in beiden Bibliotheken zu keiner Überschneidung. Bis auf wenige Ausnahmen können die ncRNA Kandidaten anhand ihres genomischen Ursprungs eindeutig charakterisiert werden. Der größte Teil liegt in intronischen Bereichen von Genen, die mit Differenzierungsprozessen oder der neuronalen Reifung in Verbindung stehen. Ein experimenteller Beweis für die tatsächliche Existenz der neu identifizierten RNAs ist nur in einem Fall möglich. Einzig die Existenz des ncRNA Kandidaten 2-57 aus der EB Bibliothek lässt sich eindeutig in Northern Blot Experimenten bestätigen. Da kleine ncRNAs jedoch häufig in nur sehr kleinen Mengen Zellen exprimiert sind, ist ein fehlender Nachweis im Northern Blot kein ausschließendes Kriterium für die tatsächliche Existenz der anderen neuen ncRNA Kandidaten. Die Identifizierung innerhalb der EB Bibliothek und der Nachweis von 2-57 in EBs im Northern Blot stellen zwei Indizien dafür dar, dass 2-57 bevorzugt in EBs exprimiert und dort eine Funktionalität besitzen könnte.

In der EB Bibliothek konnten außerdem zwei bereits bekannte ncRNAs identifiziert werden. Die Expression dieser beiden ncRNAs miR-690 und Y3 RNA kann auch im Northern Blot nachgewiesen werden. Beide zeigen eine unterschiedlich starke Expression in den verschiedenen Stadien der Differenzierung. Auffällig ist, dass zwar beide in allen untersuchten Stadien der Differenzierung auftreten, jedoch in ES Zellen und primären Neuronen stärker exprimiert sind.

Sowohl durch das *in vitro* Capping, als auch im Northern Blot kann gezeigt werden, dass ncRNAs aus nuklearen RNA Extrakten in den verschiedenen Stadien der neuronalen Differenzierung unterschiedlich exprimiert werden.

5. Diskussion

NcRNAs sind wichtige Regulatoren zellulärer Funktionen. Besonders die Steuerung der frühen embryonalen Entwicklung und von Differenzierungsprozessen wird von bestimmten ncRNA Klassen unterstützt. Ziel dieser Arbeit ist es noch unbekannte ncRNAs zu identifizieren und charakterisieren, die im Verlauf der neuronalen Differenzierung, ausgehend von ES Zellen, im Zellkern auftreten. Zur Untersuchung dieser nuklearen RNA wurden in der vorliegenden Arbeit, neben RNA Extrakten aus ES Zellen, auch Extrakte aus EBs am achten Tag der Differenzierung verwendet. Zu diesem Zeitpunkt ist das Differenzierungsprogramm der ES Zellen schon in die Richtung neuronaler Vorläuferzellen verschoben. (Bibel et al., 2004) Die Verwendung nukleare RNA Extrakte wurde aus zwei Gründen gewählt. Zum einen werden so besonders solche RNA Moleküle angereichert, die auf Grund ihres geringen Vorkommens, bei der Isolation aus Gesamt-RNA oder zytoplasmatischer RNA der Analyse entgehen. Zum anderen sind regulatorische RNA Moleküle, die ihre Funktion direkt im Zellkern vermitteln, bislang nur wenig untersucht. Die klassisch im Zellkern vorkommenden ncRNA Klassen, wie snRNA und snoRNA, haben vor allem infrastrukturelle Aufgaben. Die Funktion anderer, im Zellkern vorkommender ncRNAs, wie z.B. piRNA und Y RNA, konnte noch nicht oder nur teilweise aufgeklärt werden. Dennoch ist denkbar, dass ncRNA Moleküle auch im Zellkern wichtige regulatorische Aufgaben, sei es als direkte oder indirekte Regulatoren der Transkriptionskontrolle, durch die Steuerung der Replikation oder andere Mechanismen, übernehmen.

Durch einfache Auftrennung der nuklearen RNA Extrakte aus ES Zellen und EBs auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel lassen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Differenzierungsstufen ausmachen. Häufig vorkommenden ncRNA Moleküle, wie 5S rRNA und 5,8S rRNA, können zwar auf dem Polyacrylamidgel nachgewiesen werden, sind jedoch in beiden Extrakten etwa gleichstark vorhanden. Zur Detektion seltener und kurzer ncRNAs eignet sich diese direkte Methode, auf Grund der niedrigen Nachweisgrenze der Ethidiumbromidfärbung, jedoch nur wenig. Der direkte Nachweis von ribosomaler RNA auf dem Polyacrylamidgel lässt aber den Schluss zu, dass rRNA ein Hauptbestandteil der nuklearen RNA Extrakte ist und somit auch sehr häufig in den RNA Bibliotheken auftauchen muss. Diese Tatsache kann in den in unseren Untersuchungen bestätigt werden. So zeigt sich, dass rRNA der Hauptbestandteil aller hergestellten ncRNA Bibliotheken ist.

Kleine bzw. selten vorkommende ncRNA Moleküle können in der Regel besser mit Methoden detektiert werden, bei denen radioaktive Isotope zum Einsatz kommen. Hierzu lässt sich die ncRNA entweder am 3' oder am 5' Ende radioaktiv markieren. Das *in vitro* Capping stellt eine Sonderform der Markierung am 5' Ende dar. Durch das Einführen einer künstlichen, radioaktiven m⁷G-Cap-Struktur lassen sich ncRNAs nicht nur detektieren, sondern es werden spezifisch die RNA Moleküle nachgewiesen, die keine natürliche Cap-Struktur besitzen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die verschiedenen ncRNA Klassen auf sehr unterschiedliche Weise synthetisiert und prozessiert. Zum Teil handelt es sich um RNA Polymerase III Transkripte, die in der Regel keine natürliche Cap-Struktur besitzen. Ein Beispiel hierfür ist Y3 RNA. Desweiteren kommen auch Polymerase II Transkripte vor, die durch eine Prozessierung ihre natürliche Cap-Struktur verloren haben. Die *in vitro* Capping Reaktion wird durch das Enzym Guanylyltransferase katalysiert. Diese besitzt neben der eigentlichen Transferase-Aktivität auch eine Triphosphatase-Aktivität. Dadurch können im *in vitro* Capping Transkripte mit einem Triphosphat-Ende markiert werden. Das *in vitro* Capping eignet sich deshalb gut zu Detektion solcher ncRNAs, die direkt bei der Transkription entstehen, nicht aber für solche, die durch Exo- oder Endonukleasen aus primären Transkripten prozessiert werden. Weil mit dieser Methode nur *de novo* synthetisierte ncRNA Moleküle mit einer 5' Triphosphatstruktur nachgewiesen werden können, werden ncRNA Moleküle, die eine Cap-Struktur besitzen und in großer Zahl im Zellkern vorkommen und ncRNAs, die aus primären Transkripten durch Prozessierung entstehen, nicht erfasst. Da so ubiquitär vorkommende RNAs nicht detektiert werden, wird es einfacher Unterschiede zwischen einzelnen Proben aufzuklären.

In den durchgeführten *in vitro* Capping Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich nukleare RNA Extrakte aus ES Zellen und EBs sich in der Zusammensetzung ihrer ncRNA Moleküle ohne Cap-Struktur deutlich unterscheiden. Im Bereich der größeren RNAs (>70nt) kommt es zwar zu Überschneidungen, hierbei handelt es sich jedoch um ubiquitär vorkommende RNA Klassen, wie rRNA und tRNA. Im Größenbereich unter 70nt unterscheidet sich das Muster der RNAs jedoch deutlich. In beiden Differenzierungsstadien konnten drei Banden *in vitro* gecappter RNA unterschieden werden, die in ES Zellen und EBs in ihrer Größe variieren. Aus diesem Fakt lässt sich ableiten, dass sich das Expressionsmuster der ncRNAs während der Differenzierung der ES Zellen hin zu Neuronen schon am achten Tag der Differenzierung grundlegend geändert haben muss.

Auch die Tatsache, dass Gesamt-RNA aus Hela-Zellen, einer Zelllinie, deren Genese von neuronalen Differenzierungsmustern unabhängig ist, eine vollständig andersartige Verteilung der *in vitro* gecappten RNA Fraktion aufweist, unterstützt diese Interpretation. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Expression ncRNAs durchaus gewebe- und zeit-spezifisch auftritt. (Mattick und Makunin, 2006) Der Einfluss von ncRNAs auf die neuronale Differenzierung aus ES Zellen wurden bislang jedoch nur wenig untersucht. Einzig für bestimmte miRNAs und snoRNAs konnte eine unterschiedliche Expression während der neuronalen Entwicklung nachgewiesen und ihre Funktion teilweise entschlüsselt werden. Über spezifische ncRNAs im Größenbereich zwischen 30 nt und 70 nt, indem die von uns ausgemachten Unterschiede liegen, ist jedoch nur wenig bekannt.

Um die einzelnen Größenbereiche nicht-kodierenden regulatorischen RNA Moleküle zu ordnen zu können und so neue nukleare ncRNA Kandidaten identifizieren und charakterisieren zu können, wurden ncRNA Bibliotheken angelegt. Die jeweiligen Gesamt-Bibliotheken setzen sich aus den Bereichen zusammen, die im *in vitro* Capping Experiment identifiziert wurden. Zwar wurde vor dem Klonieren der RNA eine Größenselektion der RNA Extrakte entsprechend der Ergebnisse des *in vitro* Capping Experiment vorgenommen, jedoch erfasst die Klonierungsmethode, durch die Dephosphorylierung mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAB), neben einfach phosphorylierter RNA, auch solche mit einem di- bzw. triphosphoryliertem oder gecappten 5' Ende. (Affymetrix ENCODE Transcriptome Project, 2009)

Die durch Klonierung der RNA Extrakte aus beiden Differenzierungsstadien entstandenen Bibliotheken unterscheiden sich deutlich in der Zahl ihrer identifizierter Klone. Die EB Bibliothek ist mit 2154 Klonen, von denen 814 identifiziert und 80 sequenziert wurden, deutlich größer als die ES Bibliothek. Mit insgesamt 352 Klonen, von denen 178 identifiziert und 32 sequenziert wurden, entspricht diese nur etwa einem Zehntel der EB Bibliothek. In der Zusammensetzung der unterschiedlichen Klassen ncRNA ähneln sich die beiden Bibliotheken jedoch. Die größte Fraktion innerhalb der Bibliotheken nehmen erwartungsgemäß die rRNAs (ES: 40%, EB: 32%) und die sn/snoRNAs (ES: 21%, EB: 15%) ein. Andere bekannte ncRNAs findet man in der ES Zell-Bibliothek mit einem Anteil von 6%; in der EB Bibliothek liegt dieser Anteil bei fast 20%. In beiden Bibliotheken konnten neue ncRNA Kandidaten ermittelt werden. Ihr Anteil innerhalb der jeweiligen Bibliothek lag bei 12,5% in ES Zellen und 14,2% in EBs. Auch im Rahmen einer Hochdurchsatz-Sequenzierung von cDNA Bibliotheken aus ES Zellen und EBs, auf die in die-

ser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll, kann ein ähnliches Verteilungsmuster bekannter ncRNAs nachgewiesen werden. Durch die hierbei vorgenommene Sequenzierung mehrerer Millionen cDNA Sequenzen, kann ausgeschlossen werden, dass die Verteilung der ncRNA Klassen innerhalb der Bibliotheken zufällig ist, was, bei der relativ kleinen Anzahl sequenzierter Klonen in der vorliegenden Arbeit, ein legitimer Kritikpunkt wäre. Unterstützt wird diese These von anderen publizierten Studien, in denen ähnliche ncRNA Verteilungsmuster in anderen ncRNA Bibliotheken, aus Geweben, wie auch aus Zellen, ermittelt werden konnten. (Kawaji et. al, 2008; Mineno, 2006; Affymetrix ENCODE Transcriptome Project, 2009) Es kann also festgehalten werden, dass sich die Verteilung der ncRNA Klassen in nuklearen RNA Extrakten nur wenig von der in Gesamt-RNA Extrakten unterscheidet. Außerdem ist sie unabhängig von Differenzierungsstadien, Zelltypen oder Geweben.

Die Länge der einzelnen Sequenz, die in den beiden Bibliotheken ermittelt werden konnten, entspricht im Durchschnitt der Größenordnung der, dem Klonieren zugrunde liegenden RNA Fraktion des *in vitro* Capping Experiments. Nur wenige Sequenzen sind deutlich länger oder kürzer, als ihre Lage in einer bestimmte Teilbibliothek erwarten lassen würde. So ist z. B. die Sequenz des Klons 1-5 mit 133 nt deutlich länger, als durch ihre Lage in der EB Bibliothek 1 zu erwarten wäre.

Zusammenfassend lässt sich hervorheben, dass die beiden cDNA Bibliotheken in ihrem globalen Aufbau vergleichbar sind. Sie enthalten ncRNA Moleküle, die sowohl in ihrer Länge, als auch in ihrer statistischen Verteilung den Erwartungen entsprechen. Da gezeigt werden kann, dass die globale Verteilung der ncRNA Klassen im Zellkern vergleichbar mit der in Gesamt-RNA ist und dass sie außerdem unabhängig vom Differenzierungsstadium der ES Zellen ist, lässt sich schließen, dass die Unterschiede, die im *in vitro* Capping Experiment nachgewiesen werden können, von einzelne definierte RNA Moleküle oder kleinere Gruppen ncRNA ausgehen müssen.

Neben einer Vielzahl bekannter ncRNAs konnten in den cDNA Bibliotheken auch einige Sequenzen ermittelt werden, die keinen bekannten ncRNAs zugeordnet werden können. Insgesamt wurden 14 solche Kandidaten isoliert, zehn in der EB Bibliothek und vier in der ES Bibliothek. Ein großer Teil von ihnen ist intronischen Bereichen kodierender Gene zuzuordnen. Nur zwei liegen im Bereich von Exons. Drei Kandidaten können nicht eindeutig Genen oder intergenischen Abschnitten des Genoms zugeordnet werden. Da bekannt ist, dass ncRNAs häufig intronischen oder intergenischen Ursprungs sind, ist anzu-

nehmen, dass es sich bei den intronischen Kandidaten um neue ncRNAs handelt. (Mattick und Makunin, 2005) Bei den beiden Kandidaten exonischen Ursprungs (2-45 und 2-54) besteht die Möglichkeit, dass es sich um Verunreinigungen der cDNA Bibliothek mit mRNA Abbauprodukten handelt. Da 2-45 im proteinkodierenden Bereich des *Cdc14a* Gens liegt, ist diese Möglichkeit wahrscheinlich. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich vielleicht dennoch um eine ncRNA handelt. 2-54 konnte in der Blast-Analyse nicht eindeutig zugeordnet werden. So konnte eine gleich gute Homologie zu einem Bereich in einem Exon des *Siah1b* Gens und zu einem intronischen Bereich des Gens *AK009791*, über dessen Funktion bislang keine Erkenntnisse vorliegen, gefunden werden. Bei 2-54 wird deshalb angenommen, dass es sich mit großer Sicherheit um neue ncRNA Kandidaten. Über die drei Kandidaten, die nicht eindeutig im Genom zuordnen lassen, kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob es sich tatsächlich um neue ncRNA Kandidaten handelt. Die beiden aus der ES Bibliothek stammenden Kandidaten 2-6 und 2-7 sind mit 24 nt bzw. 30 nt relativ kurz, sodass die Blast-Analyse eine Homologie zu vielen verschiedenen Bereichen im Mausgenom liefert. Aus diesem Grund ist eine abschließende Beurteilung schwierig. Beim ncRNA Kandidat 1-5 hingegen kann mit relativer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um einen neuen ncRNA Kandidaten der EB Bibliothek handelt, sondern dass er vielmehr mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um eine Verunreinigung der Bibliothek handelt. Für diese Tatsache sprechen zwei Argumente. Zum einen ist die Sequenz des Klons 1-5, wie bereits oben ausgeführt, deutlich länger als dies zu erwarten ist, zum anderen liefert die Sequenzanalyse keine Homologie zum Mausgenom.

Gemeinsam ist allen hier identifizierten ncRNA Kandidaten, dass sie im Genom die gleiche Orientierung besitzen wie die Gene, in deren Introns bzw. Exons sie liegen. Dies lässt vermuten, dass ihre Transkription gemeinsam geregelt sein könnte.

Von den vier in der ES Bibliothek isolierten ncRNA Kandidaten konnten, wie bereit oben erwähnt, nur zwei (T1-21 und T1-27) eindeutig identifiziert werden. Beide sind 46 nt lang. T1-21 stammt aus dem Intron 6 des *Aps* Genes. (Moodie et al., 1999). *Aps* spielt als Adaptor Protein in den regulatorischen Signalwegen des Insulinstoffwechsels eine Rolle. *Aps* Protein interagiert aber auch mit der Kinase Jak2. (Kurzer et. Al, 2006) Da der Jak/Stat Signalweg an der Steuerung von Differenzierungsprozessen in Stammzellen beteiligt ist, und man über Jak2 weiß, dass es als Regulator an der Kardiomyogenese und der Hämatopoese beteiligt ist (Chung et al., 2006; Foshay et al., 2005), könnte über diese Verbindung auch *Aps* an Differenzierungsprozessen beteiligt sein. T1-27 liegt innerhalb

eines Introns des Gens *Aqr*, das durch Retinolsäure induziert wird (Sam et al., 1998) Retinolsäure stellt einen wichtiger Faktor in der Embryogenese, der Morphogenese, dem Wachstum und der Differenzierung dar und wird außerdem *in vitro* zur Induktion der neuronalen Differenzierung in EBs verwendet. (Guan et al., 2001) *Aqr* selbst wird während der Embryogenese im Mesoderm und der Neuralleiste exprimiert und kann ab Tag 8,5 *post coitum* nachgewiesen werden. (Sam et al., 1998; Cazillis et al., 2006) Sowohl dieses Expressionsmuster, als auch seine Induktion durch Retinolsäure lassen vermuten, dass *Aqr* einen Einfluss auf die Entwicklung früher Embryonen haben könnte. Da T1-27 die gleiche Orientierung auf dem Chromosom besitzt, wie das *Aqr* Gen ist anzunehmen, dass T1-27 gemeinsam mit *Aqr* transkribiert wird deshalb auch durch Retinolsäure induziert wird. Es kann deshalb angenommen werden, dass T1-27 eine Rolle bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen spielen könnte. Ob T1-21 und T1-27 tatsächlich eine Bedeutung für den Stammzellzustand bzw. die Differenzierung besitzen, bleibt zu klären. Beide ncRNA Kandidaten konnten im Northern Blot nicht detektiert werden, was eine Aussage über ihre Expression und Funktion erschwert. Der fehlgeschlagene Nachweis im Northern Blot deutet auf eine sehr geringe Expression dieser RNAs in den Zellen hin. ncRNA Kandidaten können bei zu geringer Expression im Northern Blot häufig nicht detektiert werden, so dass eine Verifizierung klonierter ncRNA nicht immer möglich ist. Dieses Phänomen konnte auch schon von anderen Gruppen für bestimmte neue ncRNA Kandidaten festgestellt werden. (Lung et al., 2006)

In der EB Bibliothek können sieben intronische ncRNA Kandidaten isoliert und identifiziert werden. Drei der ncRNA Kandidaten der EB Bibliothek (2-23, 3-46, 4-55) überschneiden sich mit Bereichen des Introns, die zwischen verschiedenen Säugetieren stark konserviert sind. Eine Konservierung intronischer Sequenzbereiche findet man häufig, wenn es sich um Sequenzen nicht-kodierender RNA handelt. Der konservierte Bereich, innerhalb dem die ncRNA Kandidaten lokalisiert sind, ist in allen drei Fällen deutlich länger, als die, durch die Klonierung und Sequenzierung, ermittelte Sequenzen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den ncRNA Kandidaten 2-23, 3-46 und 4-55 entweder um Abbauprodukte ncRNAs oder aber um prozessierte, reife ncRNAs handeln könnte. Die exakte Länge der ncRNA Kandidaten kann jedoch nicht ermittelt werden, da, außer 2-57, keine der neuen ncRNAs im Northern Blot detektiert werden konnte. Ähnlich, wie die beiden ncRNA Kandidaten aus den ES Bibliotheken, liegen die Kandidaten der EB Bibliothek vornehmlich in Introns von Genen, die mit Differenzierungsprozessen oder der neuronalen Reifung in Verbindung stehen. So findet man 2-47 in Intron 1 des *Nav2* Gens,

einem Gen dessen Expression ähnlich, wie *Aqr*, durch Retinolsäure gesteuert wird und das für die Elongation der Axone von Neuronen benötigt wird. (Muley et al, 2008) 2-57 liegt in Intron 1 des *Zfhx3* Gens. *Zfhx3* ist ein Regulator der Stat3 vermittelten Signaltransduktion. Außerdem nimmt man an, dass *Zfhx3* in Zellkern durch Steuerung des Zellzyklus die neuronale Differenzierung beeinflusst. (Nojiri et al. 2004; Jung et al. 2005) 2-55 liegt im Intron 5 des *Epha8* Gens. (Choi et al., 1999) 4-19 ist in einem Intron des *Cdh8* Gens lokalisiert, das Zellmigration steuert und eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des dendritischen Dorns spielt. (Kido et al 1998; Taniguchi et al., 2006) Die einzigen Ausnahmen stellen 3-46 und 2-52 dar. 3-46 liegt im Intron des *Tln1* Gens, welches als Protein des Zytoskeletts in der fokalen Adhesion und Zellmigration eine Rolle spielt und nicht direkt an Differenzierungsprozessen beteiligt ist. (Priddle et al., 1998) 2-52 findet sich in Intron 8 des *Ppie* Gens wieder. (Mi et al., 1996) Inwieweit die Lage der ncRNAs in spezifischen Genen von Bedeutung für die Funktion der identifizierten ncRNA Kandidaten ist und ob die auffällige Häufung von Genen, die mit Differenzierungsprozessen oder der neuronalen Reifung in Verbindung stehen, zufällig ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Prinzipiell können intronische ncRNAs zusammen mit ihren Herkunftsgenen exprimiert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Transkription beider RNAs über unterschiedliche Promotoren unabhängig voneinander geregelt ist. Es wird in der Literatur zwar spekuliert, dass zwischen der Lage einer ncRNA im Intron eines Gens und der Funktion dieser ncRNA ein Zusammenhang besteht; eindeutige Belege hierfür gibt es aber nicht. In einem einzigen Fall konnte ein solcher Zusammenhang hergestellt werden. Hierbei handelt es sich um miR-388. Über MiR-388 weiß man, dass sie eine Reihe von Genen reguliert, deren Funktion antagonistisch zu der ihres Herkunftsgens ist. (Barik, 2008)

Von allen identifizierten ncRNA Kandidaten ist 2-57 der Interessanteste. Neben seiner schon oben diskutierten Lage im Intron 1 der *Zfhx3* Gens, konnte 2-57 als einziger neuer ncRNA Kandidat im Northern Blot nachgewiesen werden. Bei der Hybridisierung der Northern Blot Membran werden zwei unterschiedlich lange Banden sichtbar, eine bei etwa 200 nt, die andere bei etwa 120 nt, wobei hier das stärkere Signal vorhanden ist. Da die sequenzierte Sequenz von 2-57 in der EB Bibliothek mit 61 nt deutlich kürzer ist, ist anzunehmen, dass es sich bei der 200 nt Form entweder um eine Vorläuferstruktur oder bei der 120 nt Form um ein Abbauprodukt handeln muss. Auffällig ist, dass 2-57 in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien verschieden stark exprimiert wird. Während

2-57 in ES Zellen und in primären Neuronen nicht nachgewiesen werden kann, ist seine Expression in EBs dagegen hoch. Seine Expression nimmt also im Verlauf der Differenzierung zu, wobei in primäre Neuronen kein 2-57 mehr detektiert werden kann. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass 2-57 während der Differenzierung, nicht aber in ausdifferenzierten Neuronen von Bedeutung sein könnte. Auffällig ist außerdem, dass 2-57 auch in AtT-20 Zellen, nicht aber in NIH3T3 Zellen, nachgewiesen werden kann. Bei AtT-20 Zellen handelt es sich um Zellen, die von einem Tumor des Hypophysenvorderlappens abstammen, und wie Neuronen, in der Embryogenese ektodermalen Ursprungs sind. Im Gegensatz zu Neuronen entstehen die Zellen des Hypophysenvorderlappens jedoch aus den Zellen des Oberflächenektoderms und grenzen sich hierdurch von den Neuronen ab, die, wie in der Einleitung unter 1.4.3 beschrieben, vom Neurektoderm abstammen. Da EBs, trotz der Induktion der neuronalen Differenzierung mit Retinolsäure, zum einem bestimmten Anteil auch aus Zellen bestehen, die noch nicht vollständig ausdifferenziert sind oder einem anderen Differenzierungsweg folgen, liegt die Vermutung nahe, dass 2-57 in EBs auch in Vorläuferzellen ektodermalen Ursprungs vorkommt, die sich nicht zu Neuronen weiterentwickeln. Um zu überprüfen, ob die Transkription von 2-57 unabhängig oder gemeinsam mit der des *Zfhx3* Gens erfolgt, wurde mittels RT PCR die Expression von *Zfhx3* auf der mRNA Ebene untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide ähnlich reguliert sind. Einzig die Expression des *Zfhx3* Gens in NIH3T3 Zellen ist deutlich ausgeprägt, während 2-57 hier kaum detektiert werden kann. Trotz dieses Unterschieds ist anzunehmen, dass 2-57 gemeinsam mit *Zfhx3* Gen transkribiert wird und anschließend durch Reifung aus dem Intron prozessiert wird. Auffällig ist, dass das *Zfhx3*, genau wie 2-57, zwar in EBs stark exprimiert ist, in primären Neuronen aber nur schwach vorhanden ist. Die hohe Expression von *Zfhx3* in den EBs stimmt mit Erkenntnissen aus Arbeiten von Watanabe et. al überein, die eine hohe Expression von *Zfhx3* im sich entwickelten Gehirn nachweisen konnten, die im Verlauf der Entwicklung von einem Maximum am Tag E10 - E15 bis zum Tag 28 nach der Geburt auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau absinkt. (Watanabe et al., 1996) Außerdem ist bekannt, dass *Zfhx3* auch in der sich entwickelnden Hypophyse exprimiert wird. Dort wird es für die Aktivierung des *Pit1* Gens benötigt, einem Transkriptionsfaktor, der als Regulator die Differenzierung somatotroper, thyrotroper und laktotroper Zelllinien steuert. (Qi et al., 2008) Ausgehend von der Erkenntnis, dass 2-57 und *Zfhx3* gemeinsam transkribiert werden, könnte dieser Fakt die nachgewiesene Expression von 2-57 in AtT-20 Zellen erklären. Neben der schon beschriebenen Expression von 2-57 in bestimmten Stadien der Differenzierung ist aus den

Northern Blots auch ersichtlich, dass 2-57 deutlich stärker in der zytoplasmatischen, als in der nuklearen Fraktionen vorkommt, was auf mögliche Funktion in Zytoplasma hindeuten kann.

Neben den neuen ncRNA Kandidaten wurden im Northern Blot auch bereits bekannte ncRNAs auf ihre Expression in den beiden Entwicklungsstadien untersucht. MiR-690 (2-1, 1-2) und Y3 RNA (4-56), die beide in der EB Bibliothek kloniert wurden, zeigten in Northern Blot eine auffällige Expression.

Bei der Hybridisierung der Membran konnte miR-690 sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus aller untersuchten RNA Extrakte nachgewiesen werden, allerdings ist nur die pre-miRNA Vorläuferstruktur zu erkennen, nicht aber die reife miRNA. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung der Ergebnisse von Tang et al. (Tang et al., 2007), die in Northern Blot Experimenten gegen miR-690 auch ausschließlich pre-miRNA Vorläuferstruktur detektieren konnten und vermuten, dass es sich bei miR-690 um eine „atypische“ miRNA handelt, die durch mangelhafte Prozessierung durch die Endonuklease Dicer als pre-miRNA akkumuliert. Im Widerspruch zu dieser Erklärung stehen aber die Ergebnisse meiner Northern Blot Experimenten. In diesen Experimenten kann gezeigt werden, dass das Signal der pre-miR-690 in der Nukleusfraktion stärker ausgeprägt ist, als in der Zytoplasmafraktion. Dies lässt darauf schließen, dass eine Reifung der pre-miRNA im Zytoplasma stattfindet, da bei einer Akkumulation der pre-miRNA das Signal im Zytoplasma eher zunehmen sollte. Es ist jedoch möglich das pre-miR-690 in einem geringeren Ausmaß, prozessiert wird, als andere „typische“ miRNAs. MiRNA-690 kann zwar in allen Zelllinien detektiert werden, jedoch ist die Expression in den EBs niedriger als in den ES Zellen. In primären Neuronen kann das deutlich stärkste Signal beobachtet werden. Ob dies von funktioneller Bedeutung ist, kann nicht abschließend geklärt werden, da nur wenige genaue Untersuchungen zur Expression und Funktion von miR-690 vorliegen.

Die zweite bekannte ncRNA, die im Northern Blot untersucht wurde, ist Y3 RNA. Hierbei konnten zwei Banden bei etwa 115 nt und 60 nt detektiert werden. Die Bande bei 115 nt entspricht der reifen Form der Ro60 assoziierten Y3 RNA (NR_024202), die laut NCBI Datenbankeintrag 101 nt lang ist. Als zytoplasmatische RNA kann Y3 im Northern Blot etwas stärker im Zytoplasma, als in der Nukleusfraktion detektiert werden. Wobei das Vorkommen im Nukleus durchaus funktionelle Bedeutung besitzen könnte, da ungebundene Y RNA auch an der semikonservativen Replikation von DNA maßgeblich beteiligt ist. (Christov et al., 2006) Die Zweite etwas schwächer ausgeprägte Bande bei 60nt ist

nur in der Zellkernfraktion zu finden. Ob es sich hierbei um ein Abbauprodukt handelt oder um eine funktionelle kurze Form der Y3 RNA bleibt zu klären. Gegen die Möglichkeit eines Degradationsprodukts spricht aber, dass dieses Produkt in allen von uns durchgeführten Northern Blot Experimenten auftritt und dabei in allen untersuchten Zellenlinien immer ausschließlich im Zellkern, nicht aber im Zytoplasma detektiert werden kann, obwohl die Y3 Expression im Zytoplasma *per se* deutlich stärker ist. Auffällig ist, dass Y3 RNA in ES Zellen und den beiden Zelllinien AtT-20 und NIH3T3 deutlich stärker exprimiert wird, als in EBs. Da aber von Christov et al. gezeigt werden konnte, dass der Abbau von Y3 zu einer zytostatischen Hemmung der Zellproliferation führt und dass Y3 in soliden Tumoren stärker exprimiert wird als in gesunden Geweben, könnte dieser Umstand mit der starken Proliferation der beiden Zelllinien und der ES Zellen zusammenhängen. (Christov et al., 2008) Die Expression in EBs ist, wegen deren verlangsamten Proliferationsrate, erniedrigt. Einzig die starke Expression in den primären Neuronen lässt sich mit diesem Modell nicht erklären. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Y3 RNA noch weitere Aufgaben erfüllt und deshalb eine Expression in Neuronen von Bedeutung ist. Eine unterschiedlich starke Expression von Y RNA im Verlauf der Entwicklung konnte bereits in verschiedenen Modellen nachgewiesen werden. (Faire-Velázquez et al., 1999; Labbé et al., 1999) Hierbei fällt auf, dass auch hier die Expression in adulten Geweben, gegenüber früheren Entwicklungsstadien, erhöht ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den beiden in dieser Arbeit untersuchten Differenzierungsstadien die globale Verteilung der ncRNAs vergleichbar ist. Dennoch werden bestimmte ncRNAs unterschiedlich exprimiert. Dies konnte zum einen durch *in vitro* Capping Experimente, zum anderen im Northern Blot gegen neue ncRNA Kandidaten bzw. bekannte ncRNAs nachgewiesen werden. Neben einer Reihe bekannter ncRNAs, die in den Differenzierungsstadien unterschiedlich exprimiert sind, können auch einige neuer ncRNA Kandidaten in ES Zellen und EBs identifiziert und charakterisiert werden. Eine funktionelle Charakterisierung ist schwierig, da die genomische Lage innerhalb bestimmter Gene nicht zwangsläufig von Bedeutung für die Funktion bestimmter ncRNAs ist. Außerdem liegen die von uns isolierten neuen ncRNA Kandidaten in einem Größenbereich zwischen 30 und 80 nt, indem nur wenig Gruppen ncRNAs bekannt sind, so dass Funktionen oder Wirkweisen nicht, anhand von Struktur- bzw. Sequenzähnlichkeiten mit bekannten ncRNA Klassen, postuliert werden können. Knockdown Experiment oder die Überexpression der hier beschriebenen ncRNA Kandidaten könnten Werkzeuge

darstellen, um erste Hinweise auf mögliche zelluläre Funktionen finden zu können. Dadurch könnte es möglich werden eine Verbindung zwischen den hier beschriebenen ncRNA Kandidaten und ihrer Funktion in der Frühen Embryonalentwicklung bzw. der neuronalen Differenzierung herzustellen. Erste Versuche einer Überexpression der neuen ncRNA lieferten keine Ergebnisse hinsichtlich eine möglichen Funktion. Ausgehend davon, dass die hier charakterisierten ncRNAs bereits in den Zellen exprimiert sind, könnte der Knockdown die geeignetere Methode sein, mit der, phänotypische Veränderungen festgestellt werden können.

In dieser Arbeit konnte außerdem klar gezeigt werden, dass das *in vitro* Capping eine geeignete Methode zur Identifizierung nicht gecappter ncRNA darstellt und dass das Expressionsmuster dieser RNAs abhängig vom Differenzierungsstadium und vom Zelltyp ist. Einziges Problem bei der Identifizierung dieser spezifischen Unterschiede ist, dass beim Klonieren mit der hier angewandten Methode auch Spezies mit natürlicher Cap-Struktur erfasst werden. Eine mögliche Lösung dieses Problems könnte es sein, mittels Immunopräzipitation, RNA Moleküle mit einer natürlichen Cap-Struktur vor dem *in vitro* Capping abzutrennen. Außerdem könnten durch einen Verzicht der Dephosphorylierung vor dem Klonieren, wie es von Pfeffer et al. im Jahr 2003 beschrieben wurde, ncRNAs mit Cap-Struktur ausgeschlossen werden. (Pfeffer et al., 2003) Diese Methode lässt aber ausschließlich 5' Monophosphate zur Adapterligation zu. 5' Monophosphate können im *in vitro* Capping jedoch eigentlich gar nicht nachgewiesen werden. Dennoch könnte das Anreichern unterschiedlicher phosphorylierter bzw. mit Cap-Strukturen modifizierter ncRNAs in cDNA Bibliotheken unser Bild über die Struktur und Funktion ncRNAs erweitern und neue regulatorische RNA Klassen zum Vorschein bringen. Die Möglichkeiten, die sich durch neue Methoden in der ncRNA Forschung ergeben, werden bei der Erweiterung unserer Vorstellung eine entscheidende Rolle spielen. Hier sei besonders die Hochdurchsatz-Sequenzierung genannt. Mit ihrer Hilfe wird es möglich, schnell und einfach, einen Überblick über das nicht-kodierende Transkriptom bestimmter Zellen und Geweben in verschiedenen Zuständen der Entwicklung und Differenzierung zubekommen. Eine Anreicherung bestimmter ncRNAs, sei es durch Unterscheidung zelluläre Kompartimente oder durch eine Fraktionierung auf Grund von Struktur- und Modifikationsunterschieden oder funktionellen Interaktionspartnern, ermöglicht in diesem Zusammenhang eine direkte Klassifizierung neuer ncRNA Kandidaten. Die Kombination aus Hochdurchsatz-Sequenzierung und der Anreicherung bestimmter ncRNAs könnte es in

Zukunft möglich machen neue ncRNA Kandidaten zu entdecken und über neue und bereits bekannte ncRNAs eine Aussage hinsichtlich möglicher Funktionen und Aufgaben in der Zelle zu treffen.

6. Anhang

6.1 Einheiten

°C	Grad Celsius
A	Ampere
B	Base
Ci	Curie
FD	Faraday
g	Gramm
J/cm ²	Joule pro Quadratzentimeter
l	Liter
m	Meter
M	Molar, mol/l
nt	Nukleotide
S	Svedberg
U/μl	Einheiten pro Mikroliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
V/cm	Volt pro Zentimeter
w/w	Gewicht pro Gewicht, Masseprozent
d	Dezi (10 ⁻¹)
c	Zenti (10 ⁻²)
k	Kilo (10 ³)
m	Milli (10 ⁻³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
n	Nano(10 ⁻⁹)

6.2 Abkürzungen

APH	aqueos prehybridization solution (Prehybridisierungslösung)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asperaginsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
cDNA	komplementär DNA
Chr.	Chromosom
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintriphosphat
denat.	denaturierend
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotheit
EB	Embyonic Body
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Embryonale Stamm...
FCS	Fötales Kälberserum
fwd.	forward (vorwärts)
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICM	innere Zellmasse
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria broth
LIF	Leukaemia inhibition factor
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
Mg	Magnesium
miRNA	micro RNA

mRNA	messenger RNA
natsiRNA	natural antisense small interfering RNA
ncRNA	nicht-kodierende RNA
NCS	neugeborenen Kälberserum
p.a.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
piRNA	piwi- interacting RNA
pol II /pol III	RNA Polymerase II / III
PTGS	Posttranskriptionales Gen-Silencing
rev.	reverse (rückwärts)
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SAM	S-Adenosin-Methionin
scaRNA	small Cajal Body RNA
scnRNA	small scan RNA
scRNA	small cytoplasmatic RNA
SDS	Natriumdodekylsulfat
siRNA	small interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
SRP	Signal recognition Particle
SSC	saline-sodium citrate
TAB	Tabacco Acid Pyrophosphatase
tasiRNA	trans acting small interfering RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetraethylendiamin
tncRNA	tiny non-coding RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

tRNA	transfer RNA
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolet
vgl.	vergleiche
X-Gal	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

6.3 Alignment neue ncRNA Kandidaten aus EB Bibliotheken:

Aufgeführt ist das jeweilige Alignment der neuen ncRNA Kandidaten gegen das Mausgenom. (NCBI Build 37 aufgenommen auf die UCSC Genome Browser Webseite im Juli 2007 <http://genome.ucsc.edu/>)

3-24

Chr. 1

```
00000001 ggtacatgatgaataaaatcaaatacaccatctttcggntgagctacctga 00000050
>>>>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| ||||||| ||||| >>>>>>>
63225254 ggtacatgatgaataaaatcaaatacaccttctttcggctgagct.cctga 63225302

00000051 tggatttgcttttttctgata 00000070
>>>>>>> ||||||||||||||||||| >>>>>>>
63225303 tggatttgcttttttctgata 63225322
```

4-22

Chr. 12

```
00000001 ggagcaggtcaaaactcccgtgctgatcagtagtgggatcgcgctgtga 00000050
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<
70462266 ggagcaggtcaaaactcccgtgctgatcagtagtgggatcgcgctgtga 70462217

00000051 atagccactgcactccagcctgggcaacatagcgagaccccgctctctt 00000098
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<
70462216 atagccactgcactccagcctgggcaacatagcgagaccccgctctctt 70462169
```

4-22

Gegen humane 7SRNA

```
001 GGAGCAGGTCAAAACTCCCGTGCTGATCAGTAGTGGGATCGCGCCTGTGAATAGCCACTG 060
>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||| >>>>
196 GGAGCAGGTCAAAACTCCCGTGCTGATCAGTAGTGGGATCGCGCCTGTGAATAGCCACTG 255

061 CACTCCAGCCTGGGCAACATAGCGAGACCCCGTCTCTTA 099
>>>> ||||||||||||||||||| >>>>
256 CACTCCAGCCTGGGCAACATAGCGAGACCCCGTCTCTTA 294
```

4-56

Chr. 6

```
00000001 gggtgggtccgagagtagtggtggtttacaactaattgatcacaaccagtta 00000050
>>>>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| >>>>>>>
47731623 gggtgggtccgagagtagtggtggtttacaactaattgatcacaaccagtta 47731672

00000051 cagattttctttgttccttctccgctcccaactgcttcacttgaccagcctt 00000100
>>>>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| >>>>>>>
47731673 cagattttctttgttccttctccgctcccaactgcttcacttgaccagcctt 47731722
```

2-23

Chr. 11

```
00000001 ggaaaacctgtgagcagtgctgggcaggaatccaactaatgaataaaaacg 00000050
>>>>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| >>>>>>>
84346126 ggaaaacctgtgagcagtgctgggcaggaatccaacaaataaataaaaacg 84346175

00000051 tctaaga 00000057
>>>>>>> ||||||| >>>>>>>
84346176 tctaaga 84346182
```

2-47

Chr. 7

```
00000001 gtcctggcagctaacaccagccgaagtgctaagaggacaagttaaaggta 00000050
>>>>>>> ||||||||||||||||||||||||||||||||||| >>>>>>>
48839804 gtcctggcagctaacaccagccgaagtgctaagaggacaagttaaaggta 48839853

00000051 atctgactata 00000061
>>>>>>> ||||||| >>>>>>>
48839854 atctgactata 48839864
```

2-52

Chr. 4

```
000000001 gggattaaaggcgtacaccaccatacctgggtttgctttttgaaactgggt 000000050
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
122806019 gggattaaaggcgtacaccaccatacctgggtttgctttttgaaactgggt 122805970

000000051 cttagagtgtgactca 000000066
<<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<<
122805969 cttagagtgtgactca 122805954
```

2-57

Chr. 8

```
000000001 gaagaacagtggcttctgccctcagatccttagaatcgtcagctcagaag 000000050
>>>>>>>> ||||||| >>>>>>>>>
111261567 gaagaacagtggcttctgccctcagatccttagaatcgtcagctcagaag 111261616

000000051 ccatt 000000056
>>>>>>>> ||||| >>>>>>>>
111261617 ccatt 111261622

000000057 cccta 000000061
>>>>>>>> ||||| >>>>>>>>
111261896 cccta 111261900
```

3-46

Chr. 4

```
000000001 aggatgatgtccttcgagctaccccttcccttccccaccccagccaagt 000000050
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
43569912 aggatgatgtccttcgagctaccccttcccttccccaccccagccaagt 43569863

000000051 tgcctcagctgacttttcaccctggatttcca 000000082
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
43569862 tgcctcagctgacttttcaccctggatttcca 43569831
```

4-19

Chr. 8

```
000000001 ggaaggacagtctcaaangataggtctggactttta 000000036
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
102015713 ggaaggacagtctcaaagataggtctggactttta 102015678

000000039 atcattaactaaatatatcatagnctgtaatgatga 000000074
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
102015676 atcattaactaaatatatcatag.ctgtaatgatga 102015642
```

4-55

Chr. 5

```
000000001 agagagaggggagatcactcagtcagcagctgacaccggagtctaact 000000050
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
136494159 agagagaggggagatcactcagtcagcagctgacaccggagtctaact 136494110

000000051 taagcccaag 000000060
<<<<<<<< ||||||| <<<<<<<<
136494109 taagcccaag 136494100
```

2-45

Chr. 3

```
000000001 cttaaagaagacaccagaagaagcgtacagagctctcctgtctggctcaa 000000050
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
116069616 cttaaagaagacaccagaagaagcgtacagagctctcctgtctggctcaa 116069567

000000051 a 000000051
<<<<<<<<< | <<<<<<<<<
116069566 a 116069566
```

2-54

Chr. X

```
000000010 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 000000059
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
160509871 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 160509822

000000060 gtcg 000000063
<<<<<<<<< |||| <<<<<<<<<
160509821 gtcg 160509818
```

Chr. 8

```
000000010 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 000000059
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
89249610 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 89249561

000000060 gtcg 000000063
<<<<<<<<< |||| <<<<<<<<<
89249560 gtcg 89249557
```

Chr. 15

```
000000010 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 000000059
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
38506261 gttgccacctattcttcagtgtcagagtgcccatcttgttttagcaact 38506212

000000060 gtcg 000000063
<<<<<<<<< |||| <<<<<<<<<
38506211 gtcg 38506208
```


1-5

gegen humanes Chr. 8

```

000000003 cctctccctccatgctgaggggtgtcaggcccccggggtgaattcgctcc 000000052
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
143249128 cctctccctccatgctgaggggtgtcaggcccccggggtgaattcgctcc 143249079

000000053 cctctccctccatgctgaggggtgtcaggccctcggggtgaattcgctcc 000000102
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
143249078 cctctccctccatgctgaggggtgtcaggccctcggggtgaattcgctcc 143249029

000000103 cctctccctccatggtgaggggtgtcagaccccc 000000135
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
143249028 cctctccctccatggtgaggggtgtcagaccccc 143248996

```

6.4 Alignment neue ncRNA Kandidaten aus ES Bibliotheken:

T1-21

Chr. 5

```

000000001 atcttcactaacttctctgtcttccttctgaccttctgtccctgtg 000000046
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
136697990 atcttcactaacttctctgtcttccttctgaccttctgtccctgtg 136697945

```

T1-27

Chr. 2

```

000000001 atccttggtgcttgctttctctttccctcagtttatctcttaga 000000045
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
113978881 atccttggtgcttgctttctctttccctcagtttatctcttaga 113978837

```

6.5 Sequenzen aller sequenzierter Klone der ES Bibliotheken

Klon	Sequenz 5'-3'	Länge	Bibliothek	Beschreibung
T1-1	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGA	42	ES-M	5S rRNA
T1-2	GATTCCCTCAGTAACGGCTAGTGAACAGGGAAGAGCCCAGCGCCGAAT	48	ES-M	28S rRNA internal spacer
T1-5	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTA	41	ES-M	5S rRNA
T1-6	CCTGGACACAAAGACGATGACGACAAAGCATCATCCTGG	39	ES-M	synthet Konstrukt
T1-7	GACGAGACGTAGCGTTCCTCCTGAGCGTGAAGCCGGCTCTAGGTGCT GCTTGACTG	57	ES-M	U3B snRNA
T1-8	ACTGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAAGCATCATCCTG	50	ES-M	synthet Konstrukt
T1-9	AGNGATGATTTACAGACTAGNAGTCTCTGACGCTGTCCTTGATGTCA GCTAG	53	ES-M	MBII-297/U52
T1-10	TTGCGGTAACGCGACCGATCCCGGAGAAGCCGGCGGGAG	39	ES-M	28S rRNA
T1-17	GACGAGACGTAGCGTTCCTCCTGAGCGTGAAGCCGGCTCTAGGTGC TGCTTGACTGCAGCA	62	ES-M	U3B snRNA
T1-20	GACGAGACGTAGCGTTCCTCCTGAGCGTGAAGCCGGCTCTAGGTGCT GCTTGACTA	57	ES-M	U3B snRNA
T1-21	ATCTTCACTAACTTCTCTGTCTTCCTTCTGACCTTCTGTCCCTGTG	46	ES-M	neue sequenz
T1-27	ATCCTTGGCTGCTTGCTTTCTCTTCCCTCAGTTTATCTCTTAGAG	46	ES-M	neue sequenz
T1-32	GAGGTGACTGAGTGTCTTTCCTGAGCGTGAAGCCGGCTTTTAGTGCT GCATTTTGCG	58	ES-M	U3AsnRNA
T2-3	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGA	42	ES-L	5S rRNA
T2-5	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGA	42	ES-L	5S rRNA
T2-6	ACTGCCGCCACCATGGACTACAAGGACGATGACGACAAAGCATCATCCTGA	51	ES-L	synthet Konstrukt
T2-17	CTGCATGATGACGAACAAATACTGACTACCTGAAGATCTTTATT	44	ES-L	Gas 5 ncRNA/homolog U44snoRNA/

T2-24	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGA	42	ES-L	5S rRNA
Klon	Sequenz 5'-3'	Länge	Bibliothek	Beschreibung
1-9	GAAAGACTAATCGAACCATCTATAGCTGGTTCCTCCGAAGTTTCCT CAGGATAGCTGGCGCTCTCGCTCTTTTA	77	ES-S	28S rRNA
1-53	nicht lesbar		ES-S	
1-63	nicht lesbar		ES-S	
2-6	GATGACGACAAAGCATCATCCTGG	24	ES-M	nicht definierbar
2-7	CTCGCAGGGAGAACTCTGCCGATCCTCCAG	30	ES-M	nicht definierbar
2-8	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAAT	30	ES-M	Z37snoRNA
2-60	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAAA	30	ES-M	Z37snoRNA
3-4	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCA	40	ES-L	5S rRNA
3-15	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGA	42	ES-L	5S rRNA
3-31	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGAG	43	ES-L	5S rRNA
3-61	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGATCA	45	ES-L	5S rRNA
3-62	GTGTCGTCTCGTTAGTATAGTGGTGAGTATCCCCGCCTGTCACG	45	ES-L	Asp-tRNA
3-64	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGCCCGATCTCGTCTGAT	43	ES-L	5S rRNA

6.6 Sequenzen aller sequenzierter Klone der EB Bibliotheken

Klon	Sequenz 5'-3'	Länge	Bibliothek	Beschreibung
1-2	TGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAAGGCTAGGCTCACAACCAAAA ATCCGCCCCC	54	EB1	mmu-miR-690 Vorläufer
1-3	GCTCTGGTCGAGGTTGGCGGTTGAGGGTGTGCGTGCGCCGAGGT GGTGACCCCC	54	EB1	18S ribosomales RNA Gen, intern transkribierter Spacer
1-5	CCTCTCCCTCCATGCTGAGGGTGTGAGGCCCCGGGGGTGAATT CGCTCCCCTCTCCCTCCATGCTGAGGGTGTGAGGCCCTCGGGGT GAATTCGCTCCCCTCTCCCTCCATGTTGAGGGTGTGAGACCCCC	133	EB1	Homologie zu einer Region auf Chr. 8 des humanen Genoms
1-12	leer		EB1	leer
1-13	GGGCACGGTGAAGAGACATGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAAG	43	EB1	28S rRNA
2-1	GGGGTTGGAGAGATGGNTCAGCCGTTAAAGGTTAGGTTACAAC CAAAAAAAAAATAT	57	EB2	mmu-miR-690 Vorläufer
2-2	GTAGCAGAGCAGCTCCCTCGCTGCGATCTATTGAAAGTCAA	41	EB2	28S rRNA
2-4	GATTCCCTCAGTAACGGCGAGTGAACAGGGAAGAGCCCAGCGC CGAAT	48	EB2	18S ribosomales RNA Gen, intern transkribierter Spacer
2-8	CACCCTGATGAACTGAATACCGCCCCAGTCTGATAGCTGTGGAG AAAGGTATTTTCTGAGT	61	EB2	U22 snoRNA
2-10	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAAGGCTAGGCTCACAACC AAAAATATAAGAGTG	59	EB2	4.5S RNA
3-2	GGCACATGATGTTCTTATTCTCACGATGGTCTTCGGATGCCACAG TTAGGGCAGTGCCGATAATGCCAAAGGCTAAGCTGATGCCA	86	EB3	U35A snoRNA
3-3	AATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAAG	28	EB3	Z37 snoRNA
3-7	nicht lesbar		EB3	
3-8	CAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAGGATTCCCTCAGTAACGGC GAGTGAACAGGGAAGAGCCCAGCGCCGAAT	73	EB3	28S rRNA

3-13	GCCGGTAGTGGTGGCGCACGCCGGTAGGATTTGCTGAAGGAGGC AGAGGCAGGAGGATCACGAGTTCGAGCCAGCCTGGGCTACACA TTTTG	93	EB3	4.5S RNA
4-1	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTAAAGGCTAGGCTCACAACC AAAAATATAAGAGTTCGGTTCACGACCCACGGCTGTCTCTCC AGCCACCTTT	98	EB4	4.5S RNA
4-3	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTAAAGGCTAGGCTCACAACC GGTGTCTGATAGGCTTT	58	EB4	5S rRNA
4-4	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTAAAGGCTAGGCTCACAACC AAAAATATAAGAGTTCGGTTCACGACCCACGGCTGTCTCTCC AGCCACCTTTAATTTT	104	EB4	4.5S RNA
4-7	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTAAAGGCTAGGCTCACAACC AAAAATATAAGAGTTCGGTTCACGACCCACGGCTGTCTCT CCAGCCACCTTTTT	100	EB4	4.5S RNA
4-13	GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCCGTAAAGGCTAGGCTCACAACC AAAAATATAAGAGTTCGGTTCACGACCCACGGCTGTCTCTCC AGCCACCATTTTT	101	EB4	4.5S RNA

Klon	Sequenz 5'-3'	Länge	Bibliothek	Beschreibung
1-17	GGAGAAGGGTTCCATGTGAACAGCAGTTGAACATGG GTCAGTCGGT	46	EB1	28S rRNA
1-19	GTAGCAGAGCAGCTCCCTCGCTGCGATCTATTGAAGTC AGCCCTCGACACAAGG	55	EB1	28S rRNA
1-24	GATCAAAGCAGGCCCGAGCCGCCTGGATACCGCAGCT AGGAATAATGGA	49	EB1	18S rRNA
1-26	GGAGAAGGGTTNCATGTGAACAGCAGTTGAACATGGG TCAGTCGGA	46	EB1	28S rRNA
1-27	nicht lesbar		EB1	

2-17	GGAAACTTCGGAGGGAACCAGCTANTAGATGGAGGAT TTTAGTCA	45	EB2	28S rRNA
2-18	GGTGAGCATAGCTGCCTTCCAAGCAGTTGACCCGGG TTCGTTTCCCGGCCAACGCACCA	59	EB2	Asp-tRNA, Gly-tRNA
2-22	GGCGAATGGCGGCCGTTCTTCTCGTTCTGCCAGCGGGCCCCT CGTCTCTCCA	52	EB2	45S pre rRNA
2-23	GGAAAACCTGTGAGCAGTGCTGGGCAGGAATCCAACCT AATGAATAAAACGTCTAAGA	57	EB2	Chr. 11 intergenischer Bereich
2-27	nicht lesbar		EB2	-
3-19	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAAT	30	EB3	Z37 snoRNA
3-23	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAA	29	EB3	Z37 snoRNA
3-24	GGTACATGATGAATAAAATCAAATCACCATCTTTTCGG NTGAGCTACCTGATGGATTTGCTTTTTCTGATA	70	EB3	homolog zu hsa U51 snoRNA
3-25	GGAATGAGGACATGTCCTGCAATTCTGAA	29	EB3	Z37 snoRNA
3-26	CACCATGGCACTACAAAGACGATGACGACAAAGCATC ATCCTGG	44	EB3	Artefakt, künstlicher Vektor pSV
4-19	GGAAGGACAGTCTCAAANGATAGGTCTGGACTTTT ACCATCATTAATAAATATATCATAGNCTGTAATGATA	74	EB4	Chr. 8, Intron cdh8
4-22	GGAGCAGGTCAAAACTCCCGTGCTGATCAGTAGTGGG ATCGCGCCTGTGAATAGCCACTGCACTCCAGCCTGGG CAACATAGCGAGACCCCGTCTCTTA	99	EB4	Chr. 12, vorhergesagtes Gen, homolog zur humanen 7SL RNA
4-25	GGGGAAAATAATGGTGGCTGGAGAGACAGCCGTGGGT GCTGGGAACCGAACTCTTATATTTTTGGTTGTGAGCCT AGCCTTTAACGGCTGAGCCATCTCTCCAGCCC	107	EB4	4.5S RNA
4-26	TGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAAGGCTAGGCTCAC AACCAAAAATATAAGAGTTTCGGTTCCCAGCACCCAC GGCTGTCTCTCCAGCCACCTTTTACCCCC	101	EB4	4.5S RNA

4-27	TCACAATGATGATGAATGGTCCAAACATTTCGCGGTTTC CACCAGAACGCAAGGCAGTGTGGCAGTTACCTTCCTT GGATGTCTGAGTGA	90	EB4	U14 snRNA
Klon	Sequenz 5'-3'	Länge	Bibliothek	Beschreibung
1-39	nicht lesbar		EB1	
1-40	GGAGCAGAAGGGCAAAAGCTCGCTTGATCTTGATTTTCA GT	41	EB1	28S rRNA
1-45	GTGAAGAGACATGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAGG	36	EB1	28S rRNA
1-46	CGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACCAAGCATC ATCCTGG	46	EB1	psV
1-48	GGAGCAGAAGGGCANAAGCTCGCTTGATCTTGATTT TCAGTACGAATACAGACCGG	56	EB1	28S rRNA
2-40	ACTGCCGCCACCATGGTACTACAAAGACNATGACGAC AAAGCATCATCCTG	51	EB2	Artefakt, künstlicher Vektor pSV
2-44	GCGCTGCGGGATGAACCGAACGCCGGGTAAAGGCGC CCGATGCCGACGCTCATCAGG	57	EB2	28S rRNA
2-45	CTTAAAGAAGACACCAGAAGAAGCGTACAGAGCTCTC CTGTCTGGCTCAAA	51	EB2	Cdc14A Exon 5,
2-47	GTNGGTGACAGTCTAACNCCAGCCGAAGTGCTAAGAG GCNCNAGTTAAAGGTAATTCTNAACTATG	66	EB2	Chr. 7, Intron Nav2,
2-48	CCTGTTGAGCTTGACTCTAGTACTGGCACGGTGAAGAGAC ATGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAGG	66	EB2	28S rRNA
3-39	nicht lesbar		EB3	
3-42	nicht lesbar		EB3	
3-43	GGAGCGAGGTGTCTGGAGTGAGGTGAGAGAAGGGGTG GGGTGGGGTCGGTNCTGGGTCCGTCTGGGACCGCCTCCGATTTC CCCT	85	EB3	18S rRNA

3-45	nicht lesbar		EB3	
3-46	NAGGATNATGTCCTTCNAGCTACCCCTTCCCTTCCC CCNNCCCCNAGCCAAGTTGCCTCAGCTGNCTTTTCAA CCCTGGATTTCACA	88	EB3	Chr. 4, Intron Tln1
4-40	AGAAAAGGTGTTGGTTGATATAGACAGCAGGACGGTG GCCATGGAAGTCGGAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAA CTCACCTGCCGAATCAACTAGCCCTGAAA	104	EB4	28S rRNA
4-42	nicht lesbar		EB4	
4-43	nicht lesbar		EB4	
4-45	GTGGAACCTGGCGCTAAACCATTTCGTAGACGACCTGCT TCCTGGGTCGGGGTTTCGTACGTAGCAGAGCAGCTC CCTCGCTGCGATCTATTGAAAGTCAG	100	EB4	28S rRNA
4-48	GTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCT GGTTCCTCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCTGGCGC TCTCGCTCTTTTG	88	EB4	28S rRNA

7. Referenzen:

- Affymetrix ENCODE Transcriptome Project; Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project, Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. *Nature*. 2009 Feb 19; 457(7232):1028-32
- Alberts B, Johnson A, Walter P, Lewis J, Raff M, Roberts K, Molecular Biology of the Cell, 2008, 5th Revised edition ,Taylor & Francis)
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D., MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *Caenorhabditis elegans*., *Curr Biol*. 2003 May 13;13(10):807-18.
- Ambros V, Chen X., The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development*. 2007 May; 134(9):1635-41
- Antal M, Boros E, Solymosy F, Kiss T., Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo., *Nucleic Acids Res*. 2002 Feb 15;30(4):912-20
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T., A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes., *Nature*. 2006 Jul 13; 442(7099):203-7.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T., The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development., *Dev Cell*. 2003 Aug; 5(2):337-50.
- Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ., Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control., *Science*. 2007 May 4; 316(5825)
- Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M., RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16499-506
- Bachellerie JP, Cavaillé J, Hüttenhofer A., The expanding snoRNA world. *Biochimie*. 2002 Aug;84(8):775-90
- Bagutti C, Wobus AM, Fässler R, Watt FM., Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells., *Dev Biol*. 1996 Oct 10;179(1):184-96
- Barik S., An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene; *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep; 36(16):5232-41
- Bartel DP, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*. 2004 Jan 23; 116(2):281-97

- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank., *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D21-5
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC., Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell.* 2007, 28, 328–336
- Betel D, Sheridan R, Marks DS, Sander C., Computational analysis of mouse piRNA sequence and biogenesis., *PLoS Comput Biol.* 2007 Nov;3(11):e222.
- Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA., Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage., *Nat Neurosci.* 2004 Sep; 7(9):1003-9
- Birnboim HC, Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24; 7(6):1513-23
- Blakaj A, Lin H., Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs.. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11; 283(15):9505-8
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK., Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 2005, 123, 1279-1291.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ., Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*, *Cell.* 2007 Mar 23; 128(6):1089-103.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957–1966
- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH., Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2006; 29:77-103
- Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ., MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline., *Dev Cell.* 2007 Apr; 12(4):503-14.
- Cavaillé J, Vitali P, Basyuk E, Hüttenhofer A, Bachellerie JP., A novel brain-specific box C/D small nucleolar RNA processed from tandemly repeated introns of a noncoding RNA gene in rats., *J Biol Chem.* 2001 Jul 13;276(28):26374-83
- Cazillis M, Rasika S, Mani S, Gressens P, Lelièvre V., In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development., *Pediatr Res.* 2006 Apr;59(4 Pt 2):48R-53R
- Cech TR, The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing, *Cell.* 1986 Jan 31; 44(2):207-10

- Chen X, Smith JD, Shi H, Yang DD, Flavell RA, Wolin SL., The Ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Curr Biol*. 2003, 13:2206– 221.
- Choi S, Jeong J, Kim T, Park S. Characterization of ephrin-A1 and ephrin-A4 as ligands for the EphA8 receptor protein tyrosine kinase., *Mol Cells*. 1999 Aug 31; 9(4):440-5.
- Chomczynski P, Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987. 162: 156–159.
- Christov CP, Gardiner TJ, Szüts D, Krude T., Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication., *Mol Cell Biol*. 2006 Sep;26(18):6993-7004.
- Christov CP, Trivier E, Krude T., Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation., *Br J Cancer*. 2008 Mar 11; 98(5):981-8
- Chung BM, Kang HC, Han SY, Heo HS, Lee JJ, Jeon J, Lim JY, Shin I, Hong SH, Cho YS, Kim CG. Jak2 and Tyk2 are necessary for lineage-specific differentiation, but not for the maintenance of self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 22;351(3):682-8
- Costa FF., Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*. 2005 Sep 12;357(2):83-94.
- Czyz J, Wobus A., Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation*. 2001 Oct;68(4-5):167-74
- Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T., Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs., *EMBO J*. 2002 Jun 3;21(11):2746-56.
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A., SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation., *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):56-61
- Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng L., Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005 Nov-Dec; 23(10):1489-501
- Du T, Zamore PD., MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005 132, 4645–4652
- Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G., A human snoRNA with microRNA-like functions., *Mol Cell*. 2008 Nov 21; 32(4):519-28.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154–156

- Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T., The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*. 2008 Apr; 135(7):1201-14.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N, Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, *Nat Rev Genet*. 2008 Feb; 9(2):102-14
- Filipowicz W, Pogacić V., Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins, *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Jun; 14(3):319-27
- Foshay K, Rodriguez G, Hoel B, Narayan J, Gallicano GI. JAK2/STAT3 directs cardiomyogenesis within murine embryonic stem cells in vitro. *Stem Cells*. 2005 Apr; 23(4):530-43.)
- Fraire-Velázquez S, Herrera-Esparza R, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Díaz E, Ontogeny of Ro hYRNAs in human heart. *Scand J Rheumatol*. 1999;28(2):100-5.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R, Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell*. 2005 Nov 18; 123(4):631-40
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ, miRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res*. 2008 36:D154-D158
- Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM., Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res*. 2001 Aug;305(2):171-6.
- Hirose T, Ideue T, Nagai M, Hagiwara M, Shu MD, Steitz JA. , A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links Position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*. 2006 23:673-684
- Hofer M, Isolation und Charakterisierung kleiner nicht codierender RNAs aus dem Zellkern von undifferenzierten und differenzierten embryonalen Stammzellen der Maus, 2006, Masterarbeit im Rahmen des Studiums der Molekularen Biotechnologie, MSc, am Institut für Molekulare Biotechnologie und Pharmazie der Fakultät für Biowissenschaften an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Ido A, Miura Y, Watanabe M, Sakai M, Inoue Y, Miki T, Hashimoto T, Morinaga T, Nishi S, Tamaoki, Cloning of the cDNA encoding the mouse ATBF1 transcription factor., *T. Gene*. 1996 Feb 12; 168(2):227-31.
- Iseki M, Takaki S, Takatsu K., Molecular cloning of the mouse APS as a member of the Lnk family adaptor proteins., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000 272, 45-54
- Jady BE, Kiss T., A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA, *Embo. J*. 2001 20, 541–551.

- Jung CG, Kim HJ, Kawaguchi M, Khanna KK, Hida H, Asai K, Nishino H, Miura Y. Homeotic factor ATBF1 induces the cell cycle arrest associated with neuronal differentiation., *Development*. 2005 Dec;132(23):5137-45
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K., Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing., *Genes Dev*. 2005 Feb 15;19(4):489-501.
- Karolchik D, Kuhn, RM, Baertsch R, Barber GP, Clawson H, Diekhans M, Giardine B, Harte RA, Hinrichs AS, Hsu F, Miller W, Pedersen JS, Pohl A, Raney BJ, Rhead B, Rosenbloom KR, Smith KE, Stanke M, Thakapallayil A, Trumbower H, Wang T, Zweig AS, Haussler D, Kent WJ. The UCSC Genome Browser Database: 2008 update. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36:D773-9
- Kawaji H, Nakamura M, Takahashi Y, Sandelin A, Katayama S, Fukuda S, Daub CO, Kai C, Kawai J, Yasuda J, Carninci P, Hayashizaki Y., Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics*. 2008 Apr 10; 9:157.
- Kent WJ. BLAT - the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*. 2002 Apr;12(4):656-64
- Kido M, Obata S, Tanihara H, Rochelle JM, Seldin MF, Taketani S, Suzuki ST., Molecular properties and chromosomal location of cadherin-8., *Genomics*. 1998 Mar 1; 48(2):186-94.
- Kim VN, Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*. 2005 Feb 28; 19(1):1-15
- Kishore S, Stamm S., The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C., *Science*. 2006 Jan 13; 311(5758):230-2
- Kiss T., Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions, *Cell*. 2002 Apr 19; 109(2):145-8.
- Klattenhoff C, Theurkauf W., Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*. 2008 Jan; 135(1):3-9.9
- Kole R, Altman S, Reconstitution of RNase P activity from inactive RNA and protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Aug;76(8):3795-9
- Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS., Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*. 2006 Apr; 24(4):857-64.
- Kurosawa H., Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2007 May;103(5):389-989
- Kurzer JH, Saharinen P, Silvennoinen O, Carter-Su C. Binding of SH2-B family members within a potential negative regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Mol Cell Biol*. 2006 Sep; 26(17):6381-94.

- Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH., A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells., *Cell*. 2004 Mar 19; 116(6):779-93
- Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O'Gorman W, Kimura H, Proudfoot NJ, Akoulitchiev A., U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation., *Nat Struct Biol*. 2002 Nov;9(11):800-5
- Labbé JC, Hekimi S, Rokeach LA. The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the *Caenorhabditis elegans* Ro60 protein. *Genetics*. 1999 Jan;151(1):143-50
- Lee Y, Kim M, Han JJ, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 23:4051–4060
- Lung B, Zemmann A, Madej MJ, Schuelke M, Techritz S, Ruf S, Bock R, Hüttenhofer A., Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(14):3842-52.
- Martin GR., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634–7638.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T., STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells., *EMBO J*. 1999 Aug 2;18(15):4261-9
- Mattaj JW, Tollervey D, Séraphin B., Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing., *FASEB J*. 1993 Jan;7(1):47-53
- Mattick JS, Makunin IV, Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 2005, Vol 14 Review Issue I, R121-R132
- Mattick JS, Makunin IV, Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R17-29
- Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ., Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing., *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 15;1677(1-3):129-41.
- Mi H, Kops O, Zimmermann E, Jäschke A, Tropschug M ,A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells., *FEBS Lett*. 1996 Dec 2; 398(2-3):201-5.
- Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mi-rochnitchenko O, Inouye M, Kato I., The expression profile of microRNAs in mouse embryos., *Nucleic Acids Res*. 2006 Mar 31;34(6):1765-71.

- Mituyama T, Yamada K, Hattori E, Okida H, Ono Y, Terai G, Yoshizawa A, Komori T, Asai K. The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotation of functional RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D89-92
- Moodie SA, Alleman-Sposeto J, Gustafson TA, Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate., *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):11186-93.
- Morris KV., RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 320:211-24.
- Muley PD, McNeill EM, Marzinke MA, Knobel KM, Barr MM, Clagett-Dame M, The atRA-responsive gene neuron navigator 2 functions in neurite outgrowth and axonal elongation. *Dev Neurobiol.* 2008 Nov; 68(13):1441-53.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A., Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4., *Cell.* 1998 Oct 30; 95(3):379-91
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG., Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr; 24(4):372-6.
- Niwa H., Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct.* 2001 Jun; 26(3):137-48.
- Nojiri S, Joh T, Miura Y, Sakata N, Nomura T, Nakao H, Sobue S, Ohara H, Asai K, Ito M, ATBF1 enhances the suppression of STAT3 signaling by interaction with PIAS3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 30; 314(1):97-103.
- Ohtsuka S, Dalton S, Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther.* 2008 Jan; 15(2):74-81
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD., Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro., *Mech Dev.* 1996 Sep;59(1):89-102
- O'Shea KS., Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells., *Biol Reprod.* 2004 Dec; 71(6):1755-65
- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC., Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science.* 2004 Jan 30; 303(5658):669-72.
- Pan G, Thomson JA., Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007 Jan;17(1):42-9
- Patel AA, Steitz JA, Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Dec;4(12):960-70.

- Perreault J, Perreault JP, Boire G., Ro-associated Y RNAs in metazoans: evolution and diversification. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug; 24(8):1678-89
- Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Tuschl T., Cloning of small RNA molecules. *Curr Protoc Mol Biol.* 2005 Nov; Chapter 26:Unit 26.4.
- Priddle H, Hemmings L, Monkley S, Woods A, Patel B, Sutton D, Dunn GA, Zicha D, Critchley DR, Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells., *J Cell Biol.* 1998 Aug 24;142(4):1121-33.
- Prujn GJ, Wiggins PA, Peters SL, Thijssen JP, van Venrooij WJ., Ro RNP associated Y RNAs are highly conserved among mammals., *Biochim Biophys Acta.* 1993 Dec 14; 1216(3):395-401.
- Qi Y, Ranish JA, Zhu X, Krones A, Zhang J, Aebersold R, Rose DW, Rosenfeld MG, Carrière C, Atbf1 is required for the Pit1 gene early activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19; 105(7):2481-6
- Rao M., Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells., *Dev Biol.* 2004 Nov 15;275(2):269-86
- Reichow SL, Hamma T, Ferré-D'Amaré AR, Varani G., The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins., *Nucleic Acids Res.* 2007;35(5):1452-64
- Richard P, Darzacq X, Bertrand E, Jádý BE, Verheggen C, Kiss T., A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs., *EMBO J.* 2003 Aug 15;22(16):4283-93.
- Rogelj B., Brain-specific small nucleolar RNAs. *J Mol Neurosci.* 2006; 28(2):103-9.
- Rutjes SA, van der Heijden A, Utz PJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ., Rapid nucleolytic degradation of the small cytoplasmic Y RNAs during apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):24799-807
- Sam M, Wurst W, Klüppel M, Jin O, Heng H, Bernstein A., Aquarius, a novel gene isolated by gene trapping with an RNA-dependent RNA polymerase motif. *Dev Dyn.* 1998 Jun; 212(2):304-17.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH., Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):55-63
- Sauer H, Hofmann C, Wartenberg M, Wobus AM, Hescheler J., Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1):13-22

- Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR., Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev.* 1991 May;5(5):728-40
- Stein AJ, Fuchs G, Fu C, Wolin SL, Reinisch KM., Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell.* 2005 May 20;121(4):529-39.
- Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001. [http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report_appendix A](http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report_appendix_A)
- Tang X, Gal J, Zhuang X, Wang W, Zhu H, Tang G, A simple array platform for micro-RNA analysis and its application in mouse tissues. *RNA.* 2007 Oct; 13(10):1803-22.
- Taniguchi H, Kawauchi D, Nishida K, Murakami F., Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain., *Development.* 2006 May;133(10):1923-31
- Theimer CA, Feigon J., Structure and function of telomerase RNA., *Curr Opin Struct Biol.* 2006 Jun;16(3):307-18
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA., Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation., *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1931-4
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R., DGCR8 is essential for micro-RNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal., *Nat Genet.* 2007 Mar; 39(3):380-5.
- Watanabe M, et al. (1996) Developmental changes in expression of the ATBF1 transcription factor gene. *Brain Res Mol Brain Res* 42:344–349.
- Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, Amarzguoui M, Aagaard L, Chen ZX, Riggs AD, Rossi JJ, Morris KV., The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells., *RNA.* 2006 Feb; 12(2):256-62.
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J., Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers., *Differentiation.* 1991 Dec;48(3):173-82
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP., MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004 304,594 -596
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A., BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3., *Cell.* 2003 Oct 31; 115(3):281-92

Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS., A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 2005 Sep 15;19(18):2164-75

Zhang B, Wang Q, Pan X., MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants, *J Cell Physiol.* 2007 Feb;210(2):279-89.

Zhang SC., Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain Pathol.* 2006 Apr;16(2):132-42.